

**EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOSTATIKA AUF DIE
DNS - SYNTHESE EINER LYMPHOBLASTEN - KULTUR
UNTER HYPERTHERMEN BEDINGUNGEN**

BETTINA VOTH

1987

Aus der Medizinischen Klinik III im Klinikum
Großhadern der Universität München
Vorstand : Professor Dr. W. Wilmanns

EINFLUSS VERSCHIEDENER ZYTOSTATIKA AUF DIE
DNS-SYNTHESE EINER LYMPHOBLASTEN-KULTUR
UNTER HYPERTHERMEN BEDINGUNGEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
BETTINA VOTH
aus Göttingen

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. H.Sauer

2. Prof. Dr. R.J.Haas

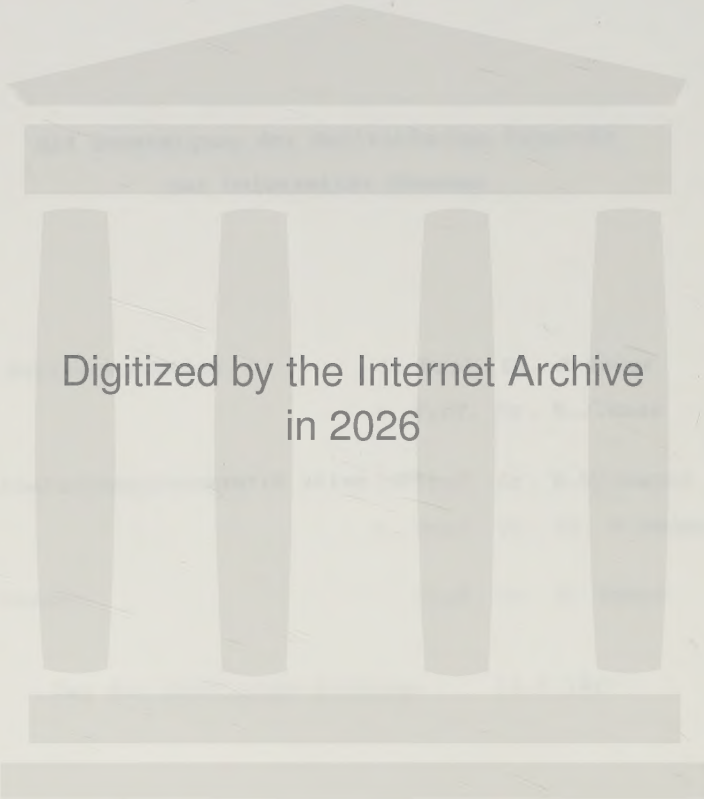
Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. W.Wilmanns

2. Prof. Dr. Dr. W.Neupert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.5.1987

Für meine Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554822_0076

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. H. Sauer, gilt mein aufrichtiger Dank für die freundliche Überlassung des Themas sowie für zahlreiche wertvolle Hinweise, anregende Diskussionen und die stete Unterstützung, die mir bei der Ausführung dieser Arbeit zuteil wurden.

Ebenso danke ich Herrn Dr. rer. nat. R. Zimmermann, der mich durch viele interessante Diskussionen während dieser Doktorarbeit unterstützte und mir sowohl bei der Lösung theoretischer als auch praktischer Probleme immer hilfreich zur Seite stand.

Die vorliegende Arbeit möge eine Erinnerung und der Beginn einer langen Zusammenarbeit mit Frau B. Schwaier sein.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

III

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL und METHODEN	11
2.1.	Material	11
2.2.	Methoden	12
2.2.1.	Züchtung der LS2-Zellen	12
2.2.2.	Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in die DNS	13
2.2.2.1.	Herstellung der Nukleosidgebrauchslösung zur Markierung der Zellen	13
2.2.2.2.	Inkubationsbedingungen	16
2.2.2.3.	Herstellung der Zytostatikallösungen	17
2.2.2.4.	Definition der Standardbedingungen	30
2.2.3.	Analytische Methoden	31
2.2.3.1.	Trypan-Blau-Methode	31
2.2.3.2.	Präzipitation der Nukleinsäuren	31
2.2.3.3.	Radioaktivitätsbestimmung	32
3.	ERGEBNISSE	33
3.1.	Temperaturabhängigkeit der DNS-Synthese von LS2-Zellen	33
3.2.	Einfluß verschiedener Zytostatika auf die Hem- mung der DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C	37

3.3.	Einfluß verschiedener Zytostatika auf die Hem- mung der DNS-Synthese von LS2-Zellen unter hyperthermen Bedingungen	51
3.4.	Temperaturstabilität der Zytostatika	77
4.	DISKUSSION	81
5.	AUSBLICK	89
6.	ZUSAMMENFASSUNG	91
7.	LITERATURVERZEICHNIS	93
	LEBENS LAUF	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADM	:	Adriamycin = Doxorubicin.
AMSA	:	Amsacrin.
BCNU	:	Bischloräthyl-nitrosourea.
BLEO	:	Bleomycin.
ARA-C	:	Arabinosid-Cytosin = Cytarabin.
CHO-Zellen	:	Permanente tierische Ovarialzelllinie (Chinesischer Hamster).
cpm	:	Counts pro Minute.
Δ cpm	:	Zählrate des experimentellen Ansatzes minus Zählrate einer 0°C-Kontrolle.
Dauno	:	Daunomycin = Daunorubicin.
DDP	:	Cis-Diamindichloroplatin = Cisplatin.
DNS	:	Deoxyribonukleinsäure.
DTIC	:	Dimethyl-Triazino-Imidazol-Carboxamid = Dacarbazin.
dTDP	:	Deoxythymidindiphosphat.
dTMP	:	Deoxythymidinmonophosphat.
dTR	:	Deoxythymidin.
dTTP	:	Deoxythymidintriphosphat.
dUMP	:	Deoxyuridinmonophosphat.
dUR	:	Deoxyuridin.
4'-EA	:	4'-Epi-Adriamycin = 4'-Epi-Doxorubicin.
EMT-6-Zellen	:	Permanente tierische Mammassarkomzelllinie (Maus)
fcs	:	Fetales Kälberserum.

5-FdUMP	:	5-Fluorodeoxyuridinmonophosphat.
5-FdUR	:	5-FUdR = 5-Fluorouracildeoxyribosid.
5-FU	:	5-Fluorouracil.
³ H	:	Tritium.
HA-1-Zellen	:	permanente tierische Ovarialzelllinie (Klonierte Derivate von CHO-Zellen vom Typ HA-1).
HNO	:	Hals-Nasen-Ohren.
IFO	:	Ifosfamid.
L-ASP	:	(L-)Asparaginase.
L1210-Zellen	:	Permanente tierische Leukämiezelllinie (Maus).
LS2-Zellen	:	Permanente menschliche Lymphoblastenzelllinie.
MG	:	Molekulargewicht.
Mitox	:	Mitoxantron.
MTX	:	Methotrexat = Amethopterin.
n	:	Anzahl der Versuche.
4-OH-CYCLO	:	4-Hydroxy-Cyclophosphamid.
RIF-Zellen	:	Permanente tierische Sarkomzelllinie (Maus).
RNA	:	Ribonukleinsäure.
s	:	Standardabweichung.
S-Phase	:	Synthese-Phase des Zellteilungszyklus
TCA	:	Trichloressigsäure.
TVF	:	Temperatur-Verstärkungs-Faktor.
VBL	:	Vinblastin.
VCR	:	Vincristinsulfat = Oncovin.
VDS	:	Vindesin.
VP 16-213	:	Etoposid.
$\bar{x}$	:	Arithmetischer Mittelwert.

1. EINLEITUNG

Maligne Erkrankungen nahmen um 1900 als Todesursache noch den siebten Platz ein, heute sind sie bereits die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen (73). Bei der Behandlung maligner Erkrankungen kommen bisher im wesentlichen chirurgische, strahlentherapeutische und internistische Maßnahmen zur Anwendung. Für lokalisierte Tumorstadien sind chirurgische und strahlentherapeutische Maßnahmen die Therapie der Wahl. Bei systemischen und metastasierenden malignen Erkrankungen werden als internistische Therapie im wesentlichen Zytostatika und Hormone eingesetzt. Die Chemotherapie hat bei diesen Erkrankungen in den letzten zwei Jahrzehnten beachtliche Erfolge erzielen können in Form von echten Heilungschancen, Remissionsinduktionen oder palliativen Therapieeffekten (64). Allerdings kann die Chemotherapie aber bei einem großen Anteil betroffener Patienten nicht den gewünschten Therapierfolg erbringen, da unerwünschte Nebenwirkungen und eingeschränkte Organfunktionen Dosisreduktionen erforderlich machen, oder sich unter einer Chemotherapie Zytostatikaresistenzen entwickeln. Hier bietet als neue Modalität in der Behandlung maligner Erkrankungen die Hyperthermie in Kombination mit der Chemotherapie die Möglichkeit, Zytostatika in ihrer Wirkung zu steigern und Zytostatikaresistenzen aufzuheben (12, 25, 31, 43, 49, 51, 58). Bei der Behandlung des malignen Melanoms hat sich die regionale hypertherme Perfusion der betroffenen Extremität in Kombination mit einer Chemotherapie bereits bewährt (19, 20, 59, 65). Die Anwendung von Hyperthermie in Kom-

bination mit Chemotherapie und Strahlentherapie bei anderen malignen Erkrankungen bzw. bei Melanometastasen wird zur Zeit in zahlreichen Studien untersucht (3, 7, 16, 38, 45, 47, 75, 77, 78, 80, 81, 87).

Hyperthermie bedeutet die Erhöhung der Körpertemperatur über den physiologischen Wert von 37°C . Bis 40°C wird von einer moderaten Hyperthermie gesprochen, darüber von einer extremen Hyperthermie. Als verschiedene Verfahren zu Erzeugung der Hyperthermie stehen heutzutage Ultraschall, Hochfrequenz, Mikro- und elektromagnetische Wellen und die regionale Perfusion zur Verfügung (41). Der erste Bericht einer tumorzerstörenden Wirkung der Hyperthermie stammt aus dem Jahre 1866 (8). Damals berichtete Busch, daß ein histologisch gesichertes Sarkom im Gesicht nach zweimaliger Erysipelinfektion, die mit hohem Fieber einherging, verschwand. Anfang des 20. Jahrhunderts entstanden zahlreiche Berichte über Tumorremissionen nach fieberhaften Infekten (6, 22). So soll z.B. Coly Patienten mit inoperablen Sarkomen und Karzinomen erfolgreich mit attenuierten Streptokokkensuspensionen behandelt haben (61). Durch die Weiterentwicklung der Strahlentherapie, Chirurgie und Chemotherapie wurde die Erkenntnis, daß Hyperthermie eine tumorzerstörende Wirkung hat, in der Onkologie zunächst in den Hintergrund gedrängt.

Die Wirkung von Hyperthermie auf Gewebe und Zellen wurde in den letzten Jahren ausführlich untersucht, sodaß die jetzige Anwendung der Hyperthermie auf die Beobachtung zurückgeht, daß Tumor-

zellen im Gegensatz zu gesundem Gewebe gegenüber Hitze empfindlicher sind und daß sowohl die Strahlentherapie als auch die Chemotherapie durch Hyperthermie in ihrer Wirkung verstärkt werden können (1, 5, 10-15, 17, 21, 24-37, 39, 41, 43, 49, 51-53, 55-60, 62, 63, 65-68, 74, 76, 79, 82, 84, 85, 88).

Unterschiedliche Durchblutungsverhältnisse in gesundem Gewebe und Tumorgewebe spielen eine entscheidende Rolle in der selektiven Wirkung der Hyperthermie auf Tumorgewebe (5, 15, 40, 49, 76, 79, 88). Gesundes Gewebe ist gut durchblutet und hypertherme Temperaturen bewirken eine Steigerung der Durchblutung (15). Tumorgewebe dagegen ist mit Ausnahme von kleinen Tumoren meist schlecht durchblutet. Dieser Zustand wird auch durch Hyperthermieeinwirkung nicht wesentlich verändert. Da eine gute Durchblutung einen schnellen Wärmeabtransport (Konvektion) über die Gefäße bewirkt, kann insofern besonders das schlecht durchblutete Tumorgewebe durch Hyperthermie erhitzt werden, ohne, daß gesundes Gewebe dabei geschädigt wird (79). Ein weiterer Unterschied zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe besteht darin, daß Tumorgefäße bereits durch hypertherme Temperaturen geschädigt werden können, die für normale Gefäße noch nicht schädlich sind (15, 76). Daraus folgende Gefäßverschlüsse und Sauerstoffmangel im Tumorgewebe bewirken, daß in den Tumorzellen, die meist schon auf Grund ihrer anaeroben Glykolyse azidotisch sind, der intrazelluläre pH-Wert noch weiter absinkt (5, 76, 88). Dieser Effekt konnte in vivo durch Erzeugung einer künstlichen Hyperglykämie sogar noch verstärkt werden (86). Diese veränderten Milieubedingungen wirken sich auf die Reaktion der Tumorzellen gegenüber

Hitze, Strahlentherapie und Chemotherapie aus und erklären, daß Tumorzellen in vivo noch hitzeempfindlicher sind als in vitro (40, 67); denn Untersuchungen haben gezeigt, daß azidotische, unterernährte und hypoxische Zellen besonders hitzesensibel sind (24, 31, 85). Azidose und Hypoxie verhindern außerdem, daß sich Tumorzellen wieder von Hitzeschäden erholen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Zellen, die sich in der Synthese-Phase (S-Phase) befinden, d.h. Zellen, die proliferieren, besonders hitzesensibel sind (13, 31). Durch diese zahlreichen Beobachtungen wird deutlich, daß die Hyperthermie bevorzugt Tumorgewebe schädigt.

Die synergistische Wirkung der Hyperthermie mit der Strahlentherapie äußert sich darin, daß Strahlenschäden, wie z.B. DNS-Einzel- und Doppelstrangbrüche und Chromosomenschäden unter der Hitze-Einwirkung nicht repariert werden (10, 12, 49). Außerdem schädigt die Hyperthermie bevorzugt hypoxische Zellen und Zellen, die sich in der S-Phase befinden, während die Strahlentherapie bevorzugt oxygenierte Zellen schädigt und S-Phase-Zellen relativ unbeeinflusst läßt (4, 13, 31).

Die synergistische Wirkung mit der Chemotherapie zeigt sich darin, daß einige Zytostatika bei hyperthermen Temperaturen eine verstärkte Zytotoxizität aufweisen. Diese Beobachtung konnte sowohl in vitro als auch in vivo in zahlreichen Experimenten bestätigt werden (1, 11, 12, 14, 20, 21, 24-30, 32, 33-37, 39, 43, 51-53, 55, 56, 58, 60, 62, 68, 74, 82, 84). Für diese Wirkungssteigerung werden die unterschiedlichsten Mechanismen diskutiert. Für einige Zytostatika scheint die Wirkungsverstärkung ähnlich

wie bei der Strahlentherapie auf verstärkte Chromosomenschädigung bzw. ausbleibende Reperaturmechanismen zurückzuführen zu sein (12, 26). Bei anderen Zytostatika scheint der azidotische pH-Wert im Tumorgewebe für die verstärkte zytostatische Wirkung verantwortlich zu sein, denn es konnte gezeigt werden, daß verschiedene Zytostatika in vitro im sauren pH-Bereich stärker wirken als im pH-Bereich des normalen Gewebes (12, 29, 85, 86). Dieser Effekt konnte in vivo durch Erzeugung einer künstlichen Hyperglykämie und der daraus resultierenden Azidose im Tumorgebiet ebenfalls demonstriert werden (85). Außerdem verändern hypertherme Temperaturen die Tumorzellmembranen oder sie beschleunigen aktive und passive Membrantransportmechanismen, sodaß eine verstärkte intrazelluläre Aufnahme von Zytostatika und damit verstärkte Zytotoxizität denkbar sind (26, 27, 50, 94, 95). Bezüglich des Problems der Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika unter einer Chemotherapie konnte beobachtet werden, daß bei einigen Zytostatika durch Hyperthermie-Einwirkung diese Resistenz wieder aufgehoben werden konnte (12, 81). Diese vielfältigen Beobachtungen lassen vermuten, daß einige Zytostatika systemisch verabreicht durch Hyperthermie lokal im Tumorgewebe verstärkt zur Wirkung gebracht werden können.

Bei der klinischen Anwendung unterscheidet man zwischen der systemischen Ganzkörperhyperthermie und der regionalen Hyperthermie, bei der letzteren weiterhin zwischen einer Oberflächen- und einer Tiefenhyperthermie. Bei der Ganzkörperhyperthermie, die bei metastasierenden bzw. systemischen malignen Erkrankungen angewendet

wird, wird die Körpertemperatur für etwa vier Stunden auf ca. $41,8^{\circ}\text{C}$ erhitzt (66). Die Temperatur sollte 42°C nicht überschreiten, da sonst Gewebeschäden in hitzesensiblen Organen wie z.B. der Leber auftreten. Bei der regionalen Hyperthermie, die sich unter anderem zur Behandlung von Tumoren im kleinen Becken (z.B. Blase, Cervix, Endometrium, Rektum) gut eignet, wird die Hitze nur lokal auf einen malignen Prozeß appliziert (58). Das gesunde Gewebe wird nicht speziell aufgeheizt. Durch Wärmeabgabe aus der erhitzten Tumorregion kann es aber als Nebenwirkung zu einer Ganzkörper-Temperatursteigerung bis maximal 39°C kommen. Bei der regionalen Hyperthermie wird angestrebt, zumindest im Tumorzentrum für etwa eine Stunde eine Temperatur zwischen 43 und 45°C zu erreichen. In gut durchbluteten Tumorarealen können diese Temperaturen nicht erreicht werden. In weiter außerhalb gelegenen Tumorbezirken, z.B. dem Tumorrand, können wegen des Wärmeverlusts generell nur niedrigere Temperaturen ($40/41^{\circ}\text{C}$) erreicht werden. Die Temperaturverteilung innerhalb eines Tumors ist heterogen. Je nach Durchblutungsverhältnissen werden Temperaturen zwischen ca. 40 bis 44°C erreicht. Maximal konnten bis zu sechs Grad Celsius Temperaturdifferenz innerhalb eines Tumors nachgewiesen werden (49).

In dieser Arbeit sollte nach Zytostatika gesucht werden, die sich zu einem weiteren Einsatz in klinischen Studien in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie eignen. Damit eine verstärkte zytostatische Wirkung durch Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie erreicht werden kann, muß zunächst einmal bekannt

sein, welche der Zytostatika durch Hyperthermie in ihrer zytostatischen Wirkung gesteigert werden. Da gesundes Gewebe bei der regionalen Hyperthermie auch bis 39°C erwärmt werden kann, ist es wichtig, zu wissen, ob es Zytostatika gibt, die erst oberhalb von $39/40^{\circ}\text{C}$ durch Hyperthermie in ihrer Wirkung verstärkt werden. Solche Zytostatika würden im Rahmen der regionalen Hyperthermie das gesunde Gewebe nicht vermehrt schädigen, d.h. auch die Nebenwirkungen, die sonst unter Umständen zu einem limitierenden Faktor werden könnten, nicht vergrößern. Idealerweise würden solche Zytostatika ihre gesteigerte zytostatische Wirkung nur im erhitzten Tumorgewebe entwickeln.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde deshalb bei verschiedenen Zytostatika in vitro untersucht, ob sie durch Hyperthermie in ihrer zytostatischen Wirkung verstärkt werden können, und welche Temperaturerhöhung notwendig ist, um diese Wirkungssteigerung auszulösen. Die zytostatische Wirkung der Medikamente wurde anhand der Inkorporation radioaktiv markierter Nukleoside in die DNS einer permanent wachsenden Lymphoblastenkultur (LS2-Kultur) überprüft. Durch relativ kurze Inkubationszeiten, Verwendung einer menschlichen Zelllinie und hyperthermen Temperaturen entsprechend denen, die bei der regionalen Hyperthermie im Tumorgewebe erreicht werden, wurde versucht, sich den klinischen Bedingungen möglichst anzupassen. Bei der Auswahl der Zytostatika wurde angestrebt, ein möglichst breites Spektrum der Medikamente zu untersuchen, die zur Behandlung maligner Erkrankung in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie eingesetzt werden

könnten.

Als Parameter für die DNS-Synthese kann die Inkorporation der radioaktiv markierten Pyrimidinnukleoside Thymidin (^3H -dTR) und Deoxyuridin (^3H -dUR) verwendet werden. Die Einbauhemmung von tritiierten Nukleosiden wird zum Beispiel bei der Testung der Sensibilität bzw. Resistenz von Tumorzellen in vitro als Zeichen deren Empfindlichkeit verwendet (44, 64). Durch Untersuchungen des DNS-Stoffwechsels in Knochenmarkszellen wurden wichtige Erkenntnisse für die klinische Anwendung der hochdosierten Methotrexatbehandlung maligner Tumoren gewonnen (69, 71, 72, 92). Untersuchungen der DNS-Synthese sind außerdem ein wichtiger Bestandteil der rationalen Kombinationsbehandlung akuter Leukämien (89, 90, 93). Kombiniert mit anderen Untersuchungen wie, z.B. zellkinetischen Daten, wird die Einbauhemmung tritierter Nukleoside als ein Kriterium bei akuten Leukämien für die Beurteilung der Erst-diagnose, besonders bei der Untergruppe der Smoldering Leukämien und bei der Beurteilung der Vollremission und Rezidive benutzt (70, 91).

Die intrazelluläre Bereitstellung von Thymidintriphosphat (dTTP) als Substrat der DNS-Synthese kann auf zwei Wegen erfolgen (93) (Abbildung 1, S. 9).

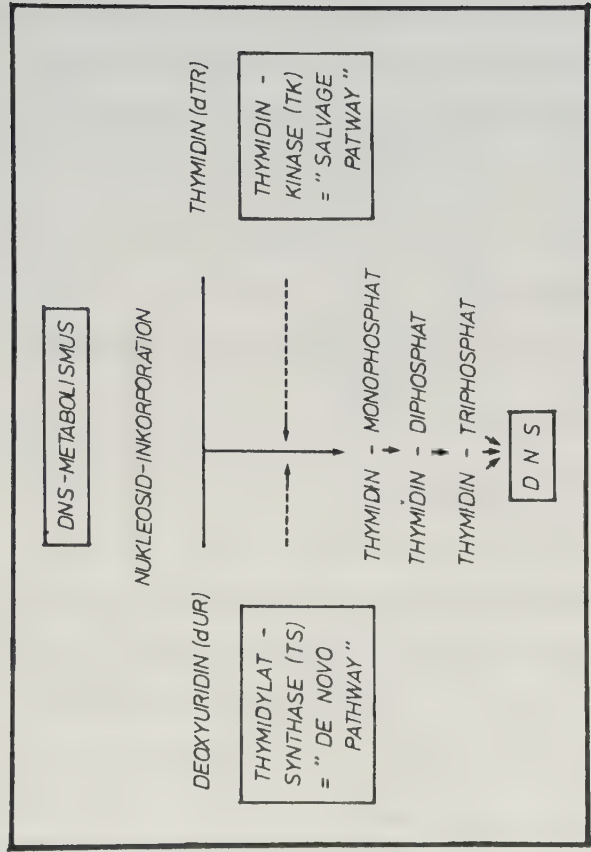


Abb. 1 DNS-METABOLISMUS

Der eine ist die "de novo"-Synthese, bei der aus phosphoryliertem dUR, dem Deoxyuridinmonophosphat (dUMP), mit Hilfe der Thymidylatsynthase und der 5-10-Methylen-Tetrahydrofolsäure als Methylgruppenspender Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) gebildet wird. Es erfolgen weitere Phosphorylierungen zu Deoxythymidindiphosphat (dTDP) und Deoxythymidintriphosphat (dTTP). Das dTTP wird dann mit Hilfe der DNS-Polymerase in die DNS eingebaut. Der zweite Weg der intrazellulären Bereitstellung von dTTP ist der "Salvage Pathway". Hierbei wird exogenes dTR mittels eines Membrancarriers in die Zelle aufgenommen, durch die Thymidinkinase zu dTMP phosphoryliert und ebenfalls nach weiteren Phosphorylierungen zu dTDP und dTTP mit Hilfe der DNS-Polymerase in die DNS eingebaut.

Setzt man Zellsuspensionen der in dieser Arbeit verwendeten permanent wachsenden Lymphoblastenkultur (LS2-Kultur) ^3H -dUR zu, wie dies in den Markierungsversuchen geschah, so wird dies in die Zellen aufgenommen und nach Phosphorylierung zu ^3H -dUMP ebenfalls der oben beschriebenen Umwandlung zu ^3H -dTMP durch eine Methylierungsreaktion unterworfen und nach weiteren Phosphorylierungen zu ^3H -dTDP und ^3H -dTTP in die DNS eingebaut. Setzt man der LS2-Zellsuspension ^3H -dTR bei Markierungsversuchen zu, so wird dies ebenfalls in die Zellen aufgenommen und nach Phosphorylierung durch die Thymidinkinase zu ^3H -dTMP und weiteren Phosphorylierungen zu ^3H -dTDP und ^3H -dTTP in die DNS eingebaut. Es resultiert eine radioaktive Markierung der DNS, die quantitativ bestimmt werden kann.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Material

RPMI 1640 Medium	Fa. Seromed
Fetales Kälberserum	Fa. Seromed
L-Glutamin	Fa. Seromed
Penicillin/Streptomycin	Fa. Seromed
Trypanblau	Fa. Serva
Trichloressigsäure	Fa. Merck
Salzsäure	Fa. Merck
Toluol	Fa. Merck
Omnifluor	Fa. NEN Chemicals
³ H-Deoxyuridin	Fa. Amersham Buchler
³ H-Thymidin	Fa. Amersham Buchler
Fluoroblastin	Fa. Farmitalia
5-Fluorouracildeoxyribosid	Fa. La Roche
Methotrexat 5 medac	Fa. Medac
Udicol	Fa. Upjohn
Daunoblastin	Fa. Farmitalia
Adriblastin	Fa. Farmitalia
Farmorubicin	Fa. Farmitalia
Mitoxantron	Fa. Cyanamid
4-OH-Cyclophosphamid	Fa. Degussa Ph.Gr.-Asta
Holoxan	Fa. Degussa Ph.Gr.-Asta
Deticene	Fa. Medac
Vincristin Liquid, Lilly	Fa. Lilly

Velbe	Fa. Lilly
Eldisine	Fa. Lilly
Platinex	Fa. Bristol
Vepesid	Fa. Bristol
Crasnitin	Fa. Bayer

2.2 Methoden

2.2.1. Züchtung der LS2-Zellen.

Bei der LS2-Kultur handelt es sich um eine Langzeitzelllinie von Lymphoblasten, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter, undifferenzierter Leukämie 1974 kultiviert wurde. Das Kulturmedium bestand aus RPMI 1640 Medium mit Zusatz von 3 mM L-Glutamin, Penicillin (100 IE/ml), Streptomycin (100 µg/ml), und 20% fetalem Kälberserum (fcs), welches 40 Minuten bei 56°C inaktiviert wurde. Die Zellen wurden in Suspension von 50 ml in Kulturflaschen (Fa. Nunc) in einem Heraeus Brutschrank bei 37°C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre, die mit 5% CO₂ angereichert war, gezüchtet. Die Zellkulturen wurden alle 48 Stunden halbiert und jeweils mit frischem Medium-fcs-Gemisch aufgefüllt. Die Verdopplungszeit der Kulturen betrug ca. 35 Stunden (46).

Zur Vorbereitung für die Versuchsansätze wurden je nach Bedarf 25 bis 50 ml Zellsuspension in der logarithmischen Wachstumsphase ca. 20 bis 24 Stunden nach der letzten Teilung in einem Zentrifu-

genröhrchen (50 ml Reaktionsgefäß, Fa. Falcon) bei Raumtemperatur für 1,5 Minuten bei 1350 x g zentrifugiert (Heraeus Christ Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde so in frischem Medium-fcs-Gemisch wieder resuspendiert, daß eine Zelldichte von 2000 Zellen/ μ l vorlag. Der prozentuale Anteil toter Zellen wurde nach dem Zentrifugieren mittels der Trypan-Blau-Methode überprüft (siehe 2.2.3.1., S. 31). Für Experimente wurden nur Zellkulturen verwendet, die weniger als 10% tote Zellen enthielten.

2.2.2. Einbau radioaktiv markierter Nukleoside in die DNS.

2.2.2.1. Herstellung der Nukleosidgebrauchslösung zur Markierung der Zellen.

Radioaktiv markierte Nukleosidlösungen wurden mit konstanter radioaktiver Konzentration von 1 mCi/ml aber mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten bezogen. Deshalb wurden den radioaktiv markierten Lösungen unmarkiertes Nukleosid zugesetzt, um so radioaktive Lösungen mit konstanten spezifischen Aktivitäten sowie konstanten Konzentrationen an gelöstem Nukleosid für die Experimente zur Verfügung zu haben. Die Menge an unmarkiertem Nukleosid, die jeweils zugegeben werden mußte, um eine spezifische Aktivität von 0,5 Ci/mMol zu erreichen, wurde folgendermaßen berechnet :

Gewünschte Gesamtkonzentration 0,1 mMol/l = 1 μ Mol/10 ml
an markiertem und unmarkiertem = 1 nMol/10 μ l
Nukleosid

Gewünschte spezifische
Aktivität 0,5 Ci/mMol

Gewünschte Gesamtmenge aus
0,5 ml radioaktiver Lösung 10 ml

Spezifische Aktivität der
radioaktiven Lösung SA in Ci/mMol oder mCi/ μ Mol

Radioaktive Konzentration 1 mCi/ml

Molekulargewichte der MG dTR 242

Nukleoside MG dUR 228

a) Nukleosidkonzentration in der markierten Lösung :

$$1 \text{ mCi} = \frac{1 \text{ } \mu\text{Mol}}{\text{SA}}$$

$$0,5 \text{ mCi} = \frac{1 \text{ } \mu\text{Mol}}{2 \text{ SA}}$$

b) Unmarkiertes Nukleosid :

Für die gewünschte Gesamtkonzentration von 1 μ Mol in 10 ml

benötigte man $(1 - \frac{1}{2 \text{ SA}})$ μ Mol unmarkiertes Nukleosid.

2 SA

$$1 \text{ mMol} = \text{MG in mg}$$

$$10 \text{ } \mu\text{Mol} = \frac{1}{100} \text{ MG in mg}$$

Aus praktischen Erwägungen wurde die abzuwiegende Nukleosidmenge für 100 ml anstelle 10 ml berechnet und abgewogen.

Die Konzentration von (1 - 1/2 SA) μMol Nukleosid sollte in einem Volumen von 9,5 ml enthalten sein, da das Volumen der markierten Lösung 0,5 ml betrug. Daraus ergab sich die Menge unmarkierten Nukleosids, die in 100 ml gelöst werden mußte :

$$\frac{100 \text{ ml}}{9,5 \text{ ml}} \times \frac{\text{MG mg}}{1000 \text{ } \mu\text{Mol}} \times \left(1 - \frac{1}{2 \text{ SA}}\right) \mu\text{Mol} = \text{mg Nukleosid/100 ml}$$

d.h.

$$0,01053 \times \text{MG} \times \left(1 - \frac{1}{2 \text{ SA}}\right) = \text{mg Nukleosid/100 ml}$$

$$\text{c) Summe :} \quad 1,0 \text{ } \mu\text{Mol/10 ml} = 0,1 \text{ mMol/l}$$

Aus praktischen Erwägungen wurde die hergestellte Nukleosidlösung unmittelbar vor einem Experiment 1 : 2,5 mit Aqua bidest. verdünnt. Von dieser Lösung wurden 5 μl zu 100 μl Zellsuspension zugegeben.

Verdünnung im Ansatz (0,1 ml Zellsuspension)	1 : 50
Konzentration im Ansatz (0,1 ml Zellsuspension)	2,0 $\mu\text{Mol/l}$
Spezifische Aktivität der Gebrauchslösung	0,5 $\text{mCi}/\mu\text{Mol}$
Aktivität im Ansatz (0,1 ml Zellsuspension)	0,1 μCi

2.2.2.2. Inkubationsbedingungen

Die auf 2000 Zellen/ μ l eingestellte LS2-Zellsuspension wurde in Mikrotiterplatten (Nuclon ,Fa. Nunc) pipettiert. Es wurden 100 μ l Zellsuspension bzw. 90 μ l Zellsuspension und 10 μ l eines Medikaments pro Vertiefung eingesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden dann für eine bestimmte Zeit, meist 30 Minuten, in einem Wasserbad (Fa. Heraeus oder Fa. Haare) und mit einer Folie abgedeckt (Pressure Sensitive Film, Fa. Falcon) vorinkubiert. Nach der Vorinkubationszeit wurden auf Eis zu den 100 μ l Zellsuspensionen je 0,1 μ Ci ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR zugegeben (siehe 2.2.2.1. S.13). Die Markierung der Zellen erfolgte danach für weitere 60 Minuten in einem Wasserbad. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt (siehe 2.2.3.2., S. 31). Es erfolgten immer Dreifachansätze, teilweise sogar Sechsfachansätze.

Parallel zu den Hyperthermie-Ansätzen wurde ein Zellsuspensionsansatz unter jeweils identischen Bedingungen aber bei 0°C mitgeführt (0°C-Kontrolle). Außerdem wurde parallel zu den jeweils getrennt durchgeführten Hyperthermie-Ansätzen ein Ansatz bei 37°C (37°C-Kontrolle) mitgeführt. Für diese beiden Kontrollansätze wurde anschließend ebenfalls die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt (siehe 2.2.3.2., S. 31).

2.2.2.3. Herstellung der Zytostatikallösungen

Die in den Versuchen getesteten Zytostatika wurden unter sterilen Bedingungen in kleinen Portionen aufbewahrt. Für die jeweiligen Versuche brauchte auf diese Weise immer nur eine Portion eines Medikaments aufgetaut zu werden. Die benötigte Menge wurde für den entsprechenden Versuch entnommen, der Rest wurde verworfen. Im Folgenden werden die verwendeten Zytostatika und deren spezielle Art der Lösung und Aufbewahrung kurz beschrieben. Die Molaritäten wurden dabei nur annäherungsweise angegeben.

1). 5-Fluorouracil (5-FU) (Abb. 2, S. 21)

Für die Herstellung der 5-FU-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Fluoroblastin in Ampullenform mit 250 mg 5-FU/5 ml verwendet. Diese Lösung (0,4 M) wurde in Portionen à 250 µl aufgeteilt und unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur gelagert.

2). 5-Fluorouracildeoxyribosid (5-FUdR = 5-FdUR) (Abb. 3, S. 21)

Für die Herstellung der 5-FdUR-Lösung wurde uns freundlicherweise von der Fa. La Roche 5-FdUR als Reinsubstanz zur Verfügung gestellt. Es wurden davon je 12,3 mg in 5 ml Aqua bidest. gelöst, und diese Lösung (10 mM) wurde in Portionen à 250 µl bei -40°C eingefroren.

3). Methotrexat (MTX) (Abb. 4, S. 22)

Für die Herstellung der MTX-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Methotrexat 5 medac mit 5 mg Methotrexat in 1 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (10 mM) wurde in Portionen à 200 µl bei -40°C eingefroren.

4). Arabinosid-Cytosin (ARA-C) = Cytarabin (Abb. 5, S. 22)

Für die Herstellung der ARA-C-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Udicil mit 100 mg ARA-C in 5 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (80 mM) wurde in Portionen a 250 µl bei -40°C eingefroren.

5). Daunorubicin = Daunomycin (Dauno) (Abb. 6, S. 23)

Für die Herstellung der Dauno-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Daunoblastin mit 20 mg Dauno-HCl in 10 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (4 mM) wurde in Portionen a 500 µl bei -40°C eingefroren.

6). Adriamycin (ADM) = Doxorubicin (Abb. 7, S. 23)

Für die Herstellung der ADM-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Adriblastin mit 10 mg ADM in 5 mg 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (4 mM) wurde in Portionen a 250 µl bei -40°C eingefroren.

7). 4'-Epi-Adriamycin (4'-EA) = 4'-Epi-Doxorubicin

(Abb. 8, S. 24)

Für die Herstellung der 4'-EA-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Farmorubicin mit 10 mg 4'-EA in 5 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (4 mM) wurde in Portionen a 250 µl bei -40°C eingefroren.

8). Mitoxantron (Mitox) (Abb. 9, S. 24)

Als Mitox-Lösung wurde ein zur klinischen Testung bestimmtes Mitoxantronpräparat in Ampullenform mit 2 mg Mitox/1 ml (4,5 mM) in Portionen a 200 µl aufgeteilt und bei -40°C eingefroren.

9). 4-OH-Cyclophosphamid (4-OH-CYCLO) (Abb. 10, S. 25)

Für die Herstellung der 4-OH-CYCLO-Lösung wurden 7 mg der Rein-

substanz in 5 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (5 mM) wurde in Portionen a 250 μ l bei -40°C eingefroren.

10). Ifosfamid (IFO) (Abb. 11, S. 25)

Für die Herstellung der IFO-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Holoxan mit 1g IFO in 25 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (0,15 M) wurde in Portionen a 1 ml bei -40°C eingefroren.

11). Dimethyl-Triazino-Imidazol-Carboxamid (DTIC) = Dacarbazin
(Abb. 12, S. 26)

Für die Herstellung der DTIC-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Deticene mit 200 mg DTIC in 20 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (55 mM) wurde in Portionen a 500 μ l bei -40°C eingefroren.

12). Vincristinsulfat (VCR) (Abb. 13, S. 26)

Für die Herstellung der VCR-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Vincristin Liquid, Lilly mit 1 mg VCR/1 ml (1 mM) in Portionen a 200 μ l aufgeteilt, und unter Lichtausschluß bei $+4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt.

13). Vinblastin (VBL) (Abb. 14, S. 27)

Für die Herstellung der VBL-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Velbe mit 10 mg VBL in 10 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (1 mM) wurde in Portionen a 500 μ l bei -40°C eingefroren.

14). Vindesin (VDS) (Abb. 15, S. 27)

Für die Herstellung der VDS-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Eldisine mit 5 mg VDS in 5 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (1 mM) wurde in Portionen a 500 μ l bei -40°C

eingefroren.

15). Cis-Diamino-Dichloro-Platin (DDP) = Cisplatin

(Abb. 16, S. 28)

Für die Herstellung der DDP-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Platinex mit 10 mg DDP/10 ml (2 mM) in Portionen a 1 ml aufgeteilt und bei -40°C eingefroren.

16). Etoposid (VP 16-213) (Abb. 17, S. 28)

Für die Herstellung der VP 16-213-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Vepesid in Ampullenform mit 100 mg VP 16-213 /5 ml (30 mM) in Portionen a 500 μl aufgeteilt und bei -40°C eingefroren.

17). L- Asparaginase (L-ASP) (Abb. 18, S. 29)

Für die Herstellung der L-ASP-Lösung wurde das kommerziell erhältliche Präparat Crasnitin mit 10.000 IE Asparaginaminohydrolase/92,6 mg im 1 ml 0,9% NaCl gelöst, und diese Lösung (10 IE / μl) wurde in Portionen a 250 μl bei -40°C eingefroren.

Aus diesen eingefrorenen Zytostatikallösungen wurden für die Versuche zur Ermittlung der Grenzkonzentration, d.h. einer bei 37°C schwach zytostatisch wirksamen Konzentration (siehe 3.2., S. 48), je nach Bedarf Verdünnungen mit steriler 0,9% NaCl hergestellt. Die ermittelte Grenzkonzentration jedes Medikaments wurde später für die Hyperthermieversuche in ihrer zehnfachen Konzentration in kleinen Portionen bei -40°C eingefroren.

Abb. 2 : 5-Fluorouracil (5-FU)

Gruppe : Antimetabolite

Wichtige Indikationen : Mammakarzinom, Karzinome des Magen-Darm-Traktes, maligne Ergüsse (73).

Wirkungsmechanismus : Pyrimidinanalogon, hemmt die dTMP-Synthese. 5-FU blockiert nach Umwandlung in 5-FdUR und dann 5-FdUMP die Thymidylatsynthase, welche für die Umwandlung von dUMP zu dTMP benötigt wird (18, 23). Damit verhindert 5-FU, daß das in den Versuchen zugesetzte ^3H -dUR über Umwandlungsprozesse als Thymidinnukleotid in die DNS der LS2-Zellen eingebaut werden kann. Das zugesetzte ^3H -dTR kann direkt in die DNS eingebaut werden. Auf Grund einer vermehrten Aktivität der Thymidinkinase, verursacht durch die verminderte Bereitstellung von ^3H -dTTP aus ^3H -dUR (d.h., eine geringere "feedback" Hemmung), wird das ^3H -dTR sogar verstärkt für die DNS-Synthese verwendet.

MG : 130,08 (57)

Strukturformel :  (57)

Abb. 3 : 5-Fluorouracildeoxyribosid (5-FUdR = 5-FdUR)

Gruppe : Antimetabolite

Wichtige Indikationen : Mammakarzinom, Karzinome des Magen-Darm-Traktes (23).
(In Deutschland nicht als Medikament zugelassen).

Wirkungsmechanismus : siehe 5-Fluorouracil (5-FU)
(Abb. 2, siehe oben)

MG : 246,21 (57)

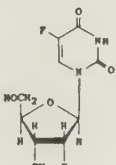
Strukturformel :  (57)

Abb. 4 : Methotrexat (MTX)

Gruppe : Antimetabolite

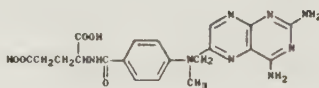
Wichtige Indikationen : Akute Leukämien, osteogenes Sarkom, Mammakarzinom, Chorionkarzinom, maligne Lymphome, Karzinome im HNO-Bereich (73).

Wirkungsmechanismus : Folsäureantagonist, hemmt die dTMP-Synthese (DNS), hemmt die Purinring-Biosynthese (RNS und DNS) (18, 23).

MTX blockiert die Dihydrofolatreduktase und verhindert somit das Entstehen von Tetrahydrofolsäure, welche nach Aktivierung von Ein-Kohlenstoff-Gruppen (= C1-Einheiten) als Methylgruppenspender bei der Umwandlung von dUMP zu dTMP benötigt wird. Damit verhindert MTX, daß das zugesetzte ^3H -dUR über Umwandlungsprozesse als Thymidinnukleotid in die DNS eingebaut werden kann. Das zugesetzte ^3H -dTR kann direkt in die DNS eingebaut werden. Auf Grund einer vermehrten Aktivität der Thymidinkinase, verursacht durch die verminderte Bereitstellung von ^3H -dTMP aus ^3H -dUR, wird das ^3H -dTR sogar verstärkt für die DNS-Synthese verwendet (siehe Wirkungsmechanismus 5-FU, Abb. 2, S. 21).

MG : 454,46 (57)

Strukturformel :



(57)

Abb. 5 : Arabinosid-Cytosin (ARA-C) = Cytarabin

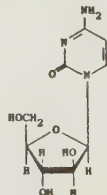
Gruppe : Antimetabolite

Wichtige Indikationen : Akute Leukämien (73)

Wirkungsmechanismus : Pyrimidinanalogon, hemmt die DNS-Polymerase (23).

MG : 243,22 (57)

Strukturformel :



(57)

Abb. 6 : Daunomycin = Daunorubicin (Dauno)

Gruppe : Antibiotika, Anthrazyklinderivat

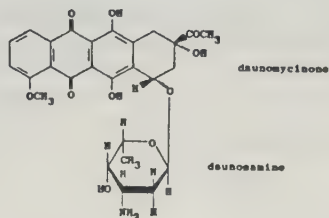
Wichtige Indikationen : Akute Leukämien (73)

Wirkungsmechanismus : Hemmung der Nukleinsäuresynthese und Proteinsynthes durch Wechselwirkungen mit der DNS (Interkalation) (23).

MG : 527,51 (57)

Strukturformel

:



(57)

Abb. 7 : Adriamycin (ADM) = Doxorubicin

Gruppe : Antibiotika, Anthrazyklinderivat

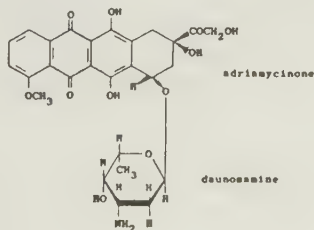
Wichtige Indikationen : Akute Leukämien, maligne Lymphome, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, maligne Hodentumoren, Weichteilsarkome, osteogenes Sarkom (73).

Wirkungsmechanismus : Siehe Daunomycin (Dauno)
(Abb. 6, siehe oben) (23).

MG : 543,54 (57)

Strukturformel

:



(57)

Abb. 8 : 4'-Epiadriamycin (4'-EA) = 4'Epi-Doxorubicin

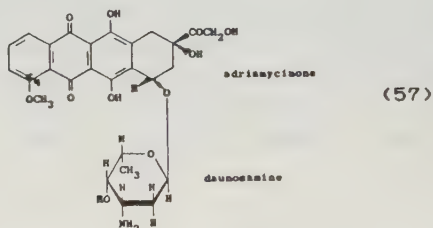
Gruppe : Antibiotika, Anthrazyklinderivat.

Wichtige Indikationen : Akute Leukämien, maligne Lymphome, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom, maligne Hodentumoren, Weichteilsarkome, osteogenes Sarkom (73).

Wirkungsmechanismus : Siehe Daunomycin (Dauno),
(Abb. 6, S. 23) (23).

MG : 543,54 (57)

Strukturformel :



Stereoisomer des ADM (9).

Abb. 9 : Mitoxantron (Mitox)

Gruppe : Antibiotika, Anthrachinonderivat.

Wichtige Indikationen : Mammakarzinom, (Leukämien,
Lymphome) (73).

Wirkungsmechanismus : DNS-Einzelstrangbrüche (2), Hemmung der
Nukleinsäuresynthese durch Wechsel-
wirkungen mit der DNS (Interkalation)
(23).

MG : 444,09 (57).

Strukturformel :

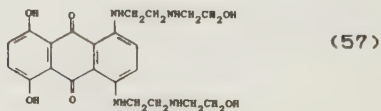


Abb. 10 : 4-OH-Cyclophosphamid (4-OH-CYCLO).

Aktiviert Form, da Cyclophosphamid in vivo erst in der Leber durch enzymatische Oxidation in eine wirksame Form, 4-OH-Cyclophosphamid, überführt wird (18).

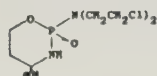
Gruppe : Alkylantien.

Wichtige Indikationen : Akute und chronische lymphatische Leukämie, Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin-Lymphome, Multiples Myelom, Neuroblastom, Mamma-, Ovarial-, Bronchialkarzinom, Wilms'-Tumor, Rhabdomyosarkom (73).

Wirkungsmechanismus : Vernetzung der DNS-Stränge und damit Hemmung der Reduplikation und Transkription (23).

MG : 278,11 (57)

Strukturformel :



(57)

Abb. 11 : Ifosfamid (IFO)

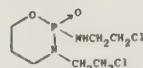
Gruppe : Alkylantien.

Wichtige Indikationen : Maligne Hodentumoren, malignes Melanom, maligne Lymphome, Karzinome, Sarkome (73).

Wirkungsmechanismus : Siehe 4-OH-Cyclophosphamid (4-OH-CYCLO), (Abb. 10, siehe oben) (23).

MG : 261,09 (57)

Strukturformel :

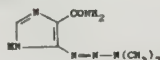


(57)

Abb. 12 : Dimethyl-Triazino-Imidazol-Carboxamid (DTIC)
= Dacarbazin

- Gruppe : Anders zytostatisch wirksame Substanzen, Triazenderivat.
- Wichtige Indikationen : Malignes Melanom, Hodgkin-Lymphom, Weichteilsarkome (73).
- Wirkungsmechanismus : Depolymerisierung der DNS (23).
- MG : 182,18 (57)

Strukturformel :

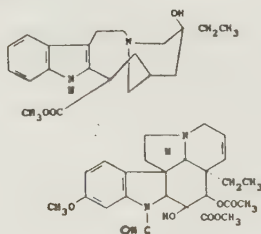


(57)

Abb. 13 : Vincristinsulfat (VCR)

- Gruppe : Vinca-Alkaloide
- Wichtige Indikationen : Akute Leukämien, maligne Lymphome, in der Kombinationstherapie bei vielen Karzinomen und Sarkomen (73).
- Wirkungsmechanismus : Hemmung der Zellteilung in der Metaphase durch Verhinderung der Bildung von Spindelproteinen (23).
- MG : 824,94 (57)

Strukturformel :



(57)

Abb. 14 : Vinblastin (VBL)

Gruppe : Vinca-Alkaloide

Wichtige Indikationen : Maligne Hodentumoren, maligne Lymphome, Histiozytose X, Karposi-Sarkom (73).

Wirkungsmechanismus : Siehe Vincristinsulfat (VCR), (Abb. 13. S. 26) (23).

MG : 811,00 (57)

Strukturformel :

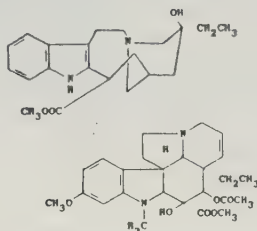


Abb. 15 : Vindesin (VDS)

Gruppe : Vinca-Alkaloide

Wichtige Indikationen : Bronchialkarzinome, maligne Melanome, Blastenschub bei chronischer myeloischer Leukämie, maligne Hodentumoren, maligne Lymphome, Histiozytose X, Karposi-Sarkom, akute Leukämien, in der Kombinations-therapie bei vielen Karzinomen und Sarkomen (73).

Wirkungsmechanismus : Siehe Vincristinsulfat (VCR), (Abb. 13, S. 26) (23).

MG : 753,95 (57).

Strukturformel :

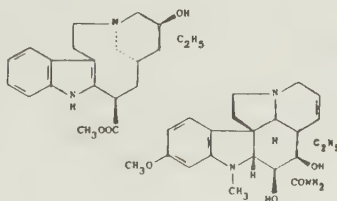


Abb. 16 : Cis-Diammino-Dichloro-Platinum (DDP)
= Cisplatin

- Gruppe : Anders zytostatisch wirksame Substanzen.
- Wichtige Indikationen : Maligne Hodentumoren, malignes Melanom, Ovarialkarzinom, Karzinome im HNO-Bereich, Sarkome (73).
- Wirkungsmechanismus : Vernetzung der DNS-Stränge und damit Hemmung der Reduplikation und Transkription (ähnlich wie die Alkylantien) (23).
- MG : 300,1 (57).
- Strukturformel :

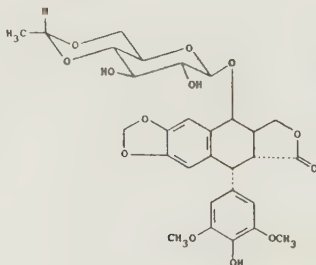


(57).

Abb. 17 : Etoposid (VP 16-213)

- Gruppe : Anders zytostatisch wirksame Substanzen, Podophyllotoxinderivat.
- Wichtige Indikationen : Bronchialkarzinome, maligne Lymphome, Chorionkarzinom (73).
- Wirkungsmechanismus : DNS Einzel- und Doppelstrangbrüche, Chromosomenaberrationen, irreversible Blockierung in der späten S- und G-Phase, Hemmung der Inkorporation radioaktiv markierter Nukleoside in verschiedene Tumorzellsystem (Hemmung des Membran-Transportsystems) (46).
- MG : 588,57 (57)

Strukturformel :



(57)

Abb. 18 : L-Asparaginase (L-ASP)

Gruppe : Anders zytostatisch wirksame Substanzen,
Gruppe der Enzyme.

Wichtige Indikationen : Akute Lymphoblastenleukämie (73).

Wirkungsmechanismus : Durch Abspaltung von Ammoniak Umwandlung
von L-Asparagin in L-Asparaginsäure und
damit Erniedrigung des L-Asparagin-
spiegels im Blut, Hemmung der Protein-
synthese (23).

MG : 133.000 + 5000 (57).

Struktur : Monomer mit vier Untereinheiten, die je
ein MG von ca. 33.000 haben (57).

2.2.2.4. Definition der Standardbedingungen

Als Standardbedingungen für alle Versuche wurde definiert :

- 1.) Es wurden nur Zellsuspensionen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden, d.h. 20 bis 24 Stunden nach der letzten Teilung.
- 2.) Es wurden nur Zellsuspensionen verwendet, die weniger als 10% tote Zellen aufwiesen.
- 3.) Die Zellsuspensionen wurden auf 2000 Zellen/ μ l eingestellt.
- 4.) Als Zellsuspensionsmenge wurden 100 μ l Medikament-Zellsuspension-Gemisch (90 μ l LS2-Zellsuspension und 10 μ l Zytostatikallösung bzw. 0,9% NaCl-Lösung) eingesetzt.
- 5.) Die Zytostatika wurden in Form von 10 μ l einer zehnfach konzentrierten Lösung zur LS2-Zellsuspension dazugegeben.
- 6.) Die Radioaktivität (0,1 μ Ci) wurde als 5 μ l ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR-Lösung (spezifische Aktivität 0,5 Ci/mMol) zugegeben.
- 7.) Die DNS wurde für 60 Minuten markiert.
- 8.) Es wurden mindestens Dreifachansätze aller Versuchsansätze gemacht.
- 9.) Eine 0°C -Kontrolle wurde zur Ermittlung der Δ_{cmp} -Werte stets mitgeführt.
- 10.) Eine 37°C -Kontrolle wurde zu Ermittlung von Korrekturfaktoren bei getrennt durchgeführten Hyperthermieansätze mitgeführt.

2.2.3. Analytische Methoden

2.2.3.1. Trypan-Blau-Methode

50 μ l Zellsuspension wurden mit 50 μ l Trypanblau (0,5% (w/v) in 0,9% NaCl) gemischt und nach 10 Minuten in einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Intakte Zellen nahmen kein Trypan-Blau auf, während in membrangeschädigten Zellen der Farbstoff angereichert wurde.

Diese Methode wurde beim Einstellen der Zellen auf 2000 Zellen/ μ l und bei der Ermittlung des prozentualen Anteils der toten Zellen in einer Zellsuspension angewendet.

2.2.3.2. Präzipitation der Nukleinsäuren

Die LS2-Zellen wurden mit Hilfe eines Zellerntegeräts (Titertek, Cell Harvester, Fa. Flow Laboratories) geerntet. Das säureunlösliche Material wurde auf Sammelfilter für je 12 Proben (Fa. Flow Laboratories) präzipitiert, indem zunächst mit ca. 3 ml kalter 5% (v/v) Trichloressigsäure (TCA) pro Probe, dann mit ca. 3 ml kalter 0,1 N Salzsäure (HCl) pro Probe gewaschen wurde. Das Sammelfilter wurde anschließend im Zellerntegerät mit Hilfe eines Vakuums vorgetrocknet. Das Gerät wurde nach jedem Versuchstag mit einer Reinigungslösung (7x Waschlösung, Fa. Flow Laboratories) und Aqua dest. durchgespült.

2.2.2.3.3. Radioaktivitätsbestimmung

Aus den vorgetrockneten Sammelfiltern wurden die einzelnen Proben ausgestanzt, in Szintillationsgefäße (Fa. Zinsser) gegeben und 30 Minuten bei $+80^{\circ}\text{C}$ getrocknet. Danach wurden die Proben 15 Minuten bei $+4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und anschließend mit 5 ml kalter Omnifluor-Toluol-Lösung (5 g Omnifluor/1 Toluol) aufgefüllt. Die Radioaktivität wurde dann in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Tri Carb 2660, Fa. Packard) für vier Minuten pro Probe bestimmt.

Die Einbauraten der 0°C -Kontrollen wurden von den jeweiligen Einbauraten der Ansätze subtrahiert (siehe 2.2.2.2., S. 16). Dieser Differenzbetrag wurde als Δ_{cmp} (counts pro Minute) bezeichnet.

Für Abbildungen, die getrennte Versuche bei verschiedenen Temperaturen zusammenfassen, wurden die einzelnen Versuche anhand der 37°C -Kontrolle einander angeglichen (siehe 2.2.2.2., S. 16).

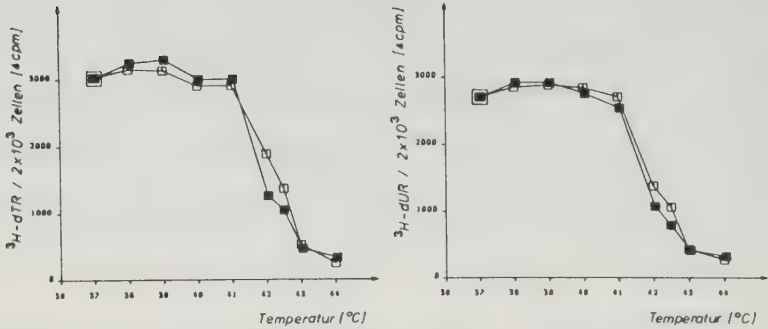
3. ERGEBNISSE

3.1. Temperaturabhängigkeit der DNS-Synthese von LS2-Zellen.

Zunächst wurde untersucht, wie sich die LS2-Zellen bei hyperthermen Temperaturen bezüglich des Einbaus radioaktiver Deoxynukleoside in die DNS verhalten. Durch kontinuierliche Temperatursteigerung sollte derjenige Temperaturbereich, in dem die DNS-Synthese durch die Hitze unbeeinflusst stattfindet, abgegrenzt werden gegenüber dem Temperaturbereich, in dem die Hitze die Zellen schädigt und demgemäß die DNS-Synthese vermindert. Damit die Zytostatika-Experimente mit den höchst möglichen, gerade noch ohne Hitzeschaden tolerierten Temperaturen durchgeführt werden konnten, wurden gleichzeitig verschiedene Inkubationszeiten für die hyperthermen Temperaturen untersucht.

Die Versuche wurden für zwei Inkubationszeiten unter Standardbedingungen (siehe 2.2.2.4., S. 30) durchgeführt, nur die Temperatur variierte. Bei allen Versuchen wurden zunächst 100 μ l Zellsuspension bei der jeweiligen hyperthermen Temperatur vorinkubiert. Dann wurden die Zellen mit ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR für weitere 60 Minuten bei 37 °C bzw. den jeweiligen hyperthermen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt.

30 Minuten hypertherme Vorinkubation



60 Minuten hypertherme Vorinkubation

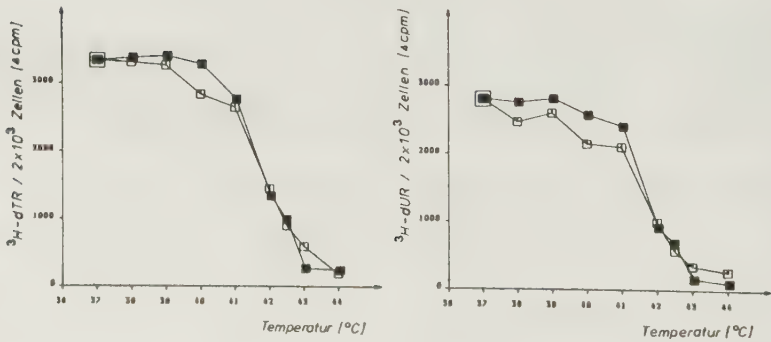


Abb. 19 Temperaturabhängigkeit der DNS-Synthese von LS2-Zellen

Abb. 19 Temperaturabhängigkeit der DNS-Synthese von
LS2-Zellen

100 μ l LS2-Zellsuspension wurde unter Standardbedingungen für 30 bzw. 60 Minuten bei einer hyperthermen Temperatur (38 bis 44°C) vorinkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen für weitere 60 Minuten bei 37°C bzw. den jeweiligen hyperthermen Bedingungen in Gegenwart von 0,1 μ Ci ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR/100 μ l Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt. Die einzelnen Werte für die verschiedenen Temperaturen wurden alle in getrennten Versuchen bestimmt.

Die Radioaktivität in Δ cpm (counts pro Minute) /100 μ l Zellsuspension ist in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

☐ Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

■ Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei entsprechenden hyperthermen Bedingungen.

☒ Vorinkubation bei 37°C, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

Abb. 19 (S. 34) stellt den temperaturabhängigen Einbau von ^3H -dTR und ^3H -dUR in die DNS von LS2-Zellen im Bereich von 37 bis 44°C dar. Aus dieser Graphik wird deutlich, daß bei denjenigen LS2-Zellen, die nur 30 Minuten einer hyperthermen Vorinkubation ausgesetzt waren, die DNS-Synthese bis 41°C durch die Hitze unbeeinflusst blieb. Bei dieser Vorinkubationszeit bestand bis 41°C kein Unterschied zwischen den nach 37°C zurückgesetzten Zellsuspensionen (d.h. insgesamt 30 Minuten Hyperthermie-Einwirkung) und den bei hyperthermer Temperatur weiter inkubierten Zellsuspensionen (d.h. insgesamt 90 Minuten Hyperthermie-Einwirkung). Die Temperaturen oberhalb von 41°C wurden am besten von denjenigen LS2-Zellen toleriert, die der Hyperthermie-Einwirkung insgesamt nur 30 Minuten ausgesetzt waren.

Bei den LS2-Zellen, die 60 Minuten einer hyperthermen Vorinkubation ausgesetzt waren, wurde die DNS-Synthese schon bei 41°C reduziert, und oberhalb von 41°C war die DNS-Synthese stärker eingeschränkt als bei 30 minütiger hyperthermer Vorinkubation.

Außerdem scheint bei 60 minütiger hyperthermer Vorinkubation oberhalb von 41°C kein Unterschied zwischen der kürzeren Hyperthermie-Einwirkung der nach 37°C zurückgesetzten Zellsuspensionen (d.h. insgesamt 60 Minuten Hyperthermie-Einwirkung) und der längeren Hyperthermie-Einwirkung der bei hyperthermen Bedingungen weiter inkubierten Zellsuspensionen (d.h. insgesamt 120 Minuten Hyperthermie-Einwirkung) zu bestehen.

Da bei 30 minütiger hyperthermer Vorinkubation die DNS-Synthese bis 41°C durch hypertherme Temperaturen unbeeinflusst blieb, in

diesem Temperaturbereich kein Unterschied zwischen insgesamt 30 und 90 Minuten Hyperthermie-Einwirkung bestand, und die Zellen Temperaturen bis $42,5^{\circ}\text{C}$ noch relativ gut tolerierten, wurden sämtliche Experimente, die die Wirkungen von Zytostatika auf die DNS-Synthese der LS2-Zellen unter hyperthermen Bedingungen untersuchten, mit 30 minütiger Vorinkubation im Temperaturbereich von 38 bis $42,5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die beiden unterschiedlichen Markierungsbedingungen (37°C bzw. hypertherme Temperatur) wurden für die Hyperthermie-Experimente beibehalten.

3.2. Einfluß verschiedener Zytostatika auf die Hemmung der DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C .

Um in späteren Versuchen eine durch Hyperthermie verstärkte, zytostatische Wirkung einzelner Medikamente nachweisen zu können, wurde zunächst bei 37°C die sog. Grenzkonzentration für jedes Medikament ermittelt. Als Grenzkonzentration eines Medikaments wurde diejenige Konzentration bezeichnet, die bei 37°C schwach zytostatisch wirksam war, d.h., eine Hemmung des ^3H -dTR- bzw. ^3H -dUR-Einbaus in die DNS um 20 bis 40% bewirkte.

Die Versuche wurden unter Standardbedingungen (siehe 2.2.2.4., S. 30) durchgeführt. Zellsuspensionen wurden mit den jeweiligen Medikamenten in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit physiologischer Kochsalzlösung für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wurde die DNS mit ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR für 60 Minuten mar-

kiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt. Für jedes der 17 untersuchten Zytostatika wurde zunächst versucht, anhand des Einbaus der radioaktiv markierten Nukleoside in die DNS der LS2-Zellen das Wirkungsspektrum vom zytostatisch unwirksamen Bereich über den schwach zytostatisch wirksamen Bereich (Grenzkonzentration) bis zum stark zytostatisch wirksamen Bereich nachzuweisen (siehe Abb. 20-36, S. 39-47). Danach wurde durch noch feinere Konzentrationsabstufungen diejenige Konzentration eines Zytostatikums ermittelt, die eine Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS um 20 bis 40% bewirkte. Die so ermittelten Grenzkonzentrationen wurden anschließend auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft.

Um eine möglichst große Zahl von Medikamenten, die in der Hyperthermie-Behandlung bei malignen Erkrankungen eingesetzt werden könnten, abzudecken, wurden folgende Medikamente untersucht : aus der Gruppe der Antimetabolite das 5-Fluorouracil (5-FU), 5-Fluorouracildeoxyribosid (5-FdUR), Methotrexat (MTX) und Arabinosid-Cytosin (ARA-C), aus der Gruppe der Anthrazykline und Anthrachinone das Daunomycin (Dauno), Adriamycin (ADM), 4'-Epi-Adriamycin (4'-EA) und Mitoxantron (Mitox), aus der Gruppe der Vinca-Alkaloide das Vincristinsulfat (VCR), Vinblastin (VBL) und Vindesin (VDS), aus der Gruppe der Alkylantien das Ifosfamid (IFO), 4-OH-Cyclophosphamid (4-OH-CYCLO) und Dimethyl-Triazino-Imidazol-Carboxamid (DTIC, Dacarbacin) und aus der Gruppe der anders zytostatisch wirksamen Substanzen das Etoposid (VP 16-213), Cis-Diamindichloroplatin (DDP, Cisplatin) und die L-Asparaginase (L-ASP).

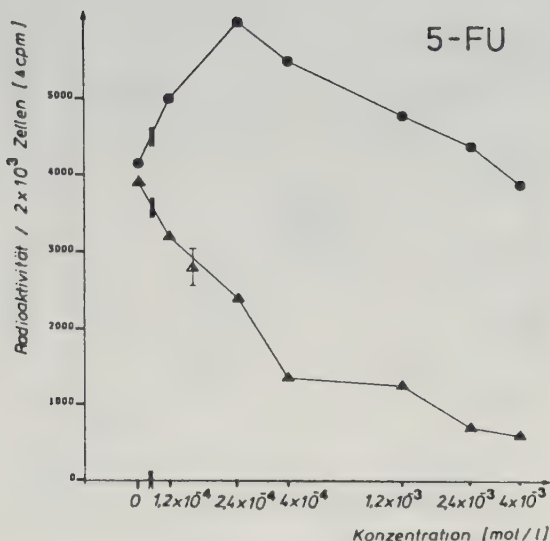


Abb. 20 Einfluß von 5-FU auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C.

Methodik und Legende gilt für Abb. 20-36, S. 39-47 :

90 µl Zellsuspension und 10 µl eines Zytostatikums wurden unter Standardbedingungen für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen für weitere 60 Minuten bei 37°C in Gegenwart von 0,1 µCi ³H-dTR bzw. ³H-dUR/100 µl Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt.

Die Radioaktivität in Δcpm/100 µl Zellsuspension ist in Abhängigkeit von der Konzentration des Zytostatikums in der Zellsuspension dargestellt.

- Radionuklideinbau in die DNS nach Gabe von ³H-dTR.
- ▲ Radionuklideinbau in die DNS nach Gabe von ³H-dUR.
- I Grenzkonzentration (siehe Tab. 1, S. 48), Radionuklideinbau in die DNS nach Zugabe von ³H-dUR.
- I Grenzkonzentration (siehe Tab. 1, S. 48), Radionuklideinbau in die DNS nach Zugabe von ³H-dTR.

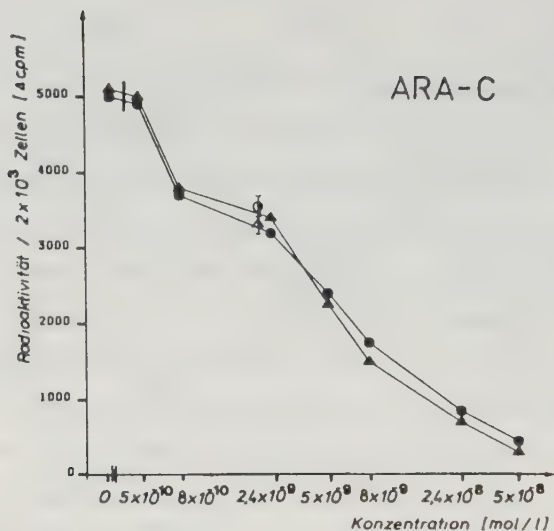


Abb. 23 Einfluß von ARA-C auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

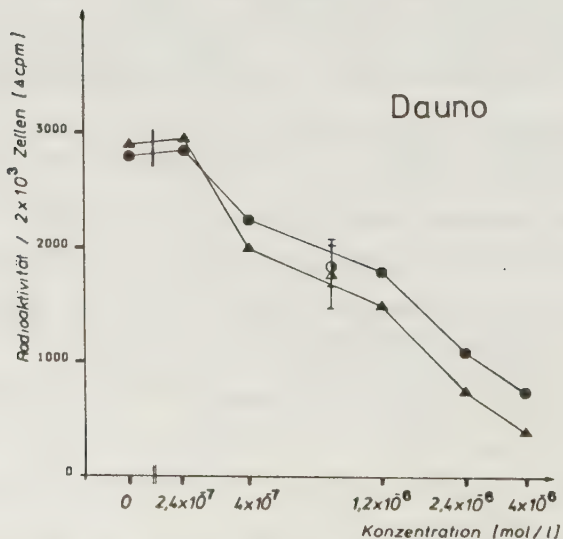


Abb. 24 Einfluß von Dauno auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

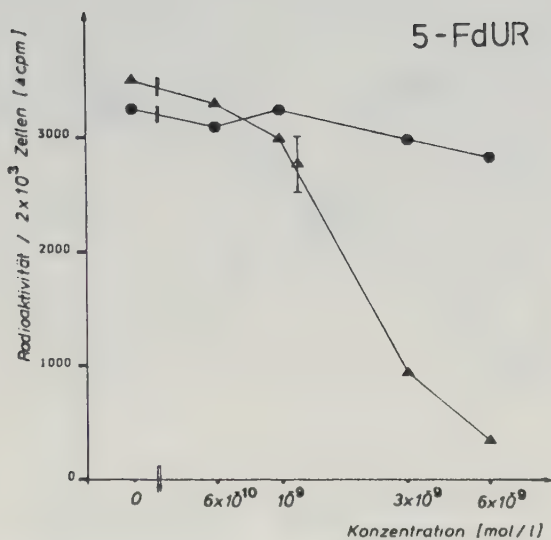


Abb. 21 Einfluß von 5-FdUR auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

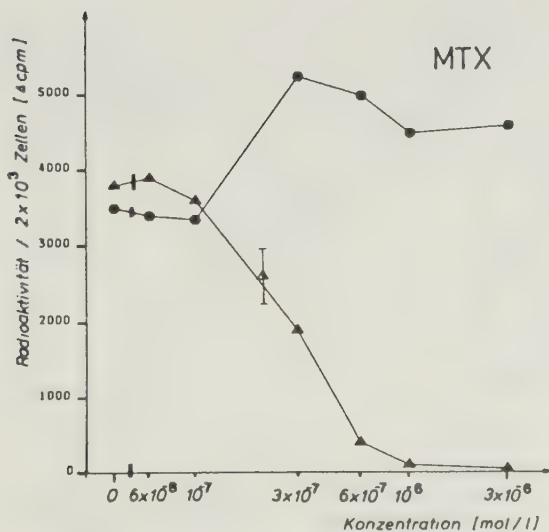


Abb. 22 Einfluß von MTX auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

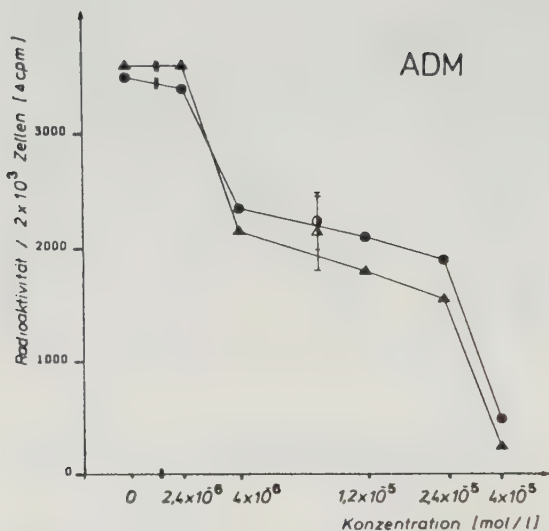


Abb. 25 Einfluß von ADM auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

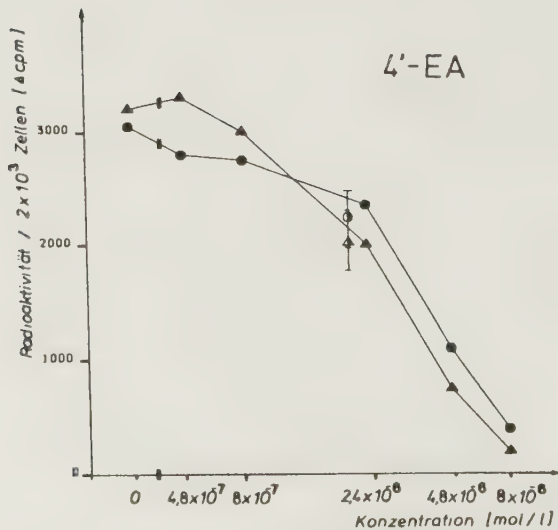


Abb. 26 Einfluß von 4'-EA auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

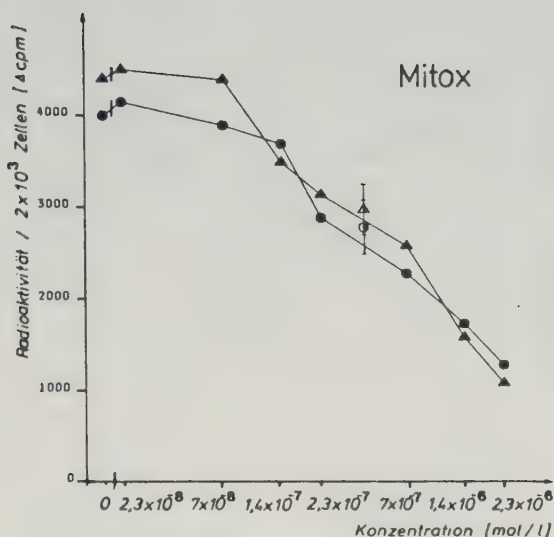


Abb. 27 Einfluß von Mitox auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

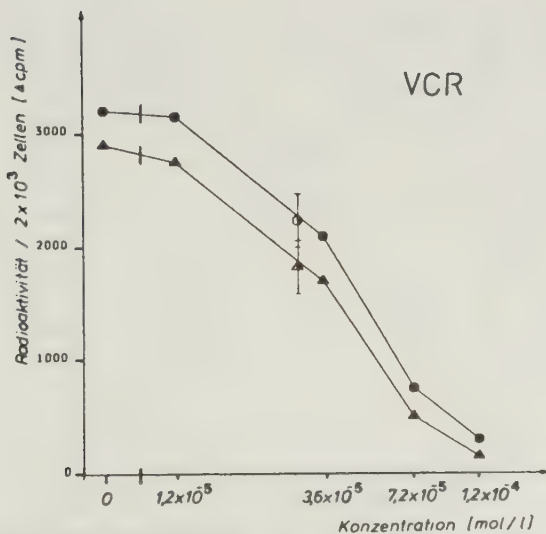


Abb. 28 Einfluß von VCR auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

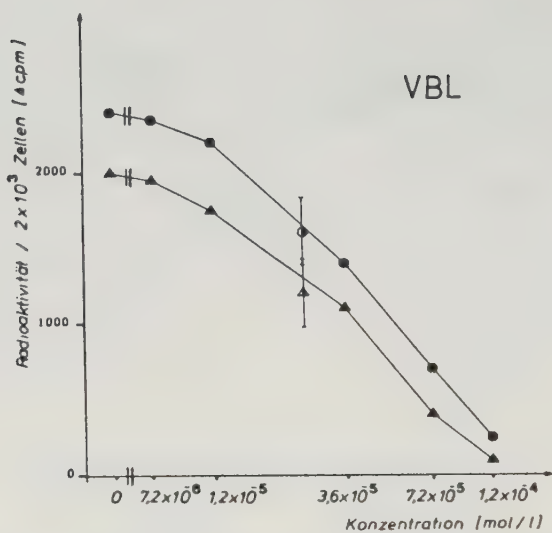


Abb. 29 Einfluß von VBL auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

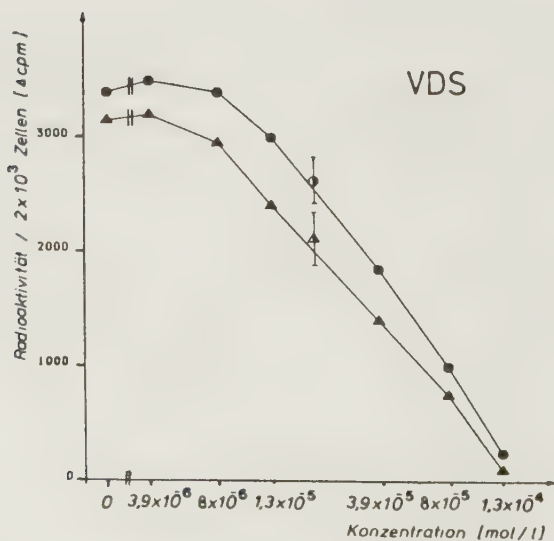


Abb. 30 Einfluß von VDS auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

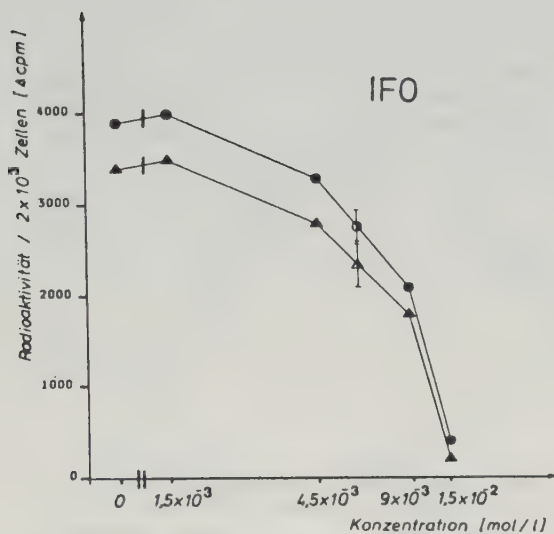


Abb. 31 Einfluß von IFO auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

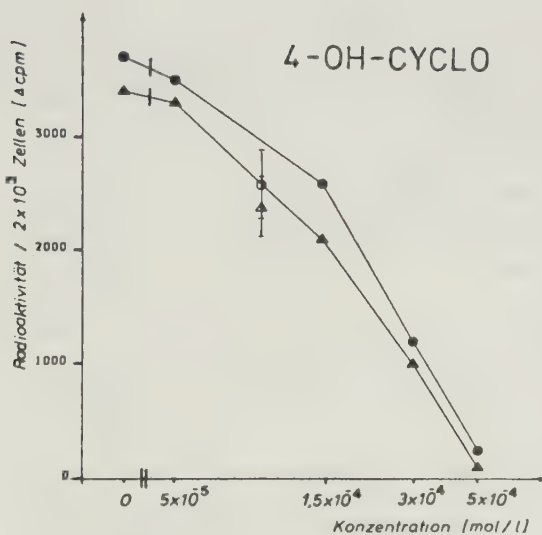


Abb. 32 Einfluß von 4-OH-CYCLO auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

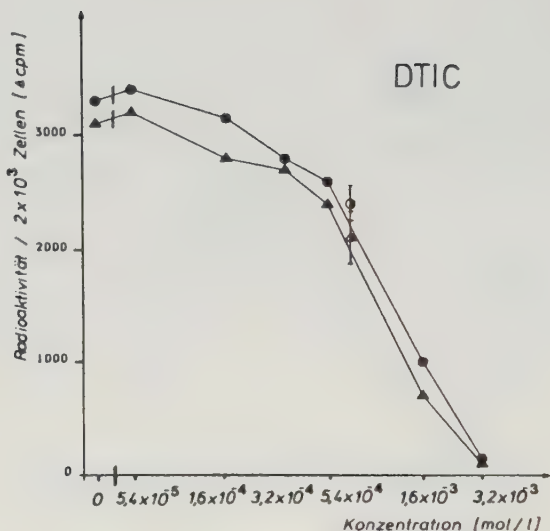


Abb. 33 Einfluß von DTIC auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

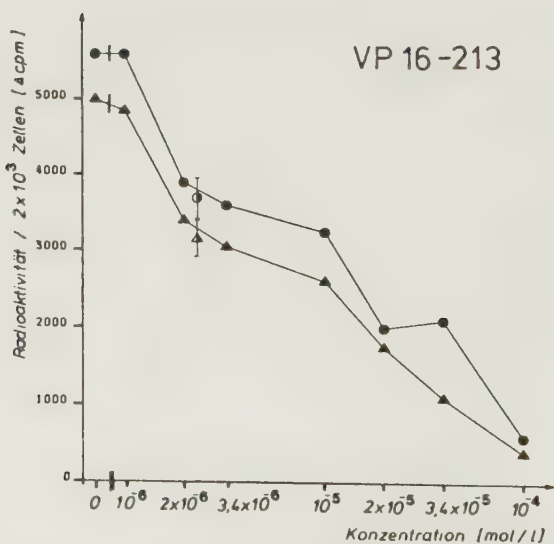


Abb. 34 Einfluß von VP 16-213 auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

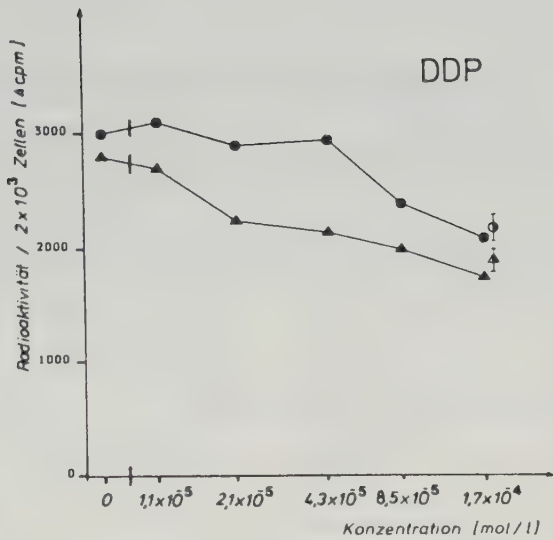


Abb. 35 Einfluß von DDP auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

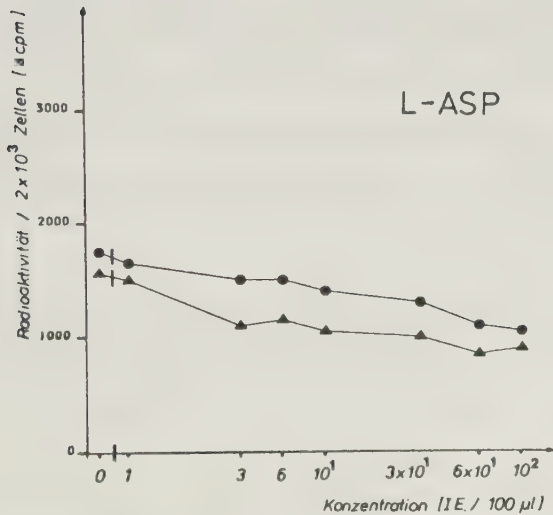


Abb. 36 Einfluß von L-ASP auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen bei 37°C
Methodik und Legende siehe Abb. 20, S. 39.

Tabelle 1 : Grenzkonzentrationen verschiedener Zytostatika und deren Wirkung auf den Einbau radioaktiver Nukleoside in die DNS.

Medikament	Grenzkonzentration (mol/l)	Hemmung des Nukleosideinbaus (%)	
		dTR ($\bar{x} \pm s$)	dUR ($\bar{x} \pm s$)
1) Antimetabolite			
a) 5-FU	$1,5 \times 10^{-4}$	* 0, n=10	32 ± 10 , n=10
b) 5-FdUR	$1,2 \times 10^{-7}$	* 0, n=12	20 ± 7 , n=12
c) MTX	2×10^{-9}	* 0, n=10	31 ± 9 , n=10
d) ARA-C	2×10^{-9}	29 ± 4 , n= 8	35 ± 7 , n= 6
2) Anthrazykline und Anthrachinone			
a) Dauno	8×10^{-7}	34 ± 6 , n=12	39 ± 11 , n=12
b) ADM	8×10^{-6}	36 ± 8 , n=11	40 ± 11 , n=11
c) 4'-EA	2×10^{-6}	27 ± 8 , n=10	37 ± 8 , n=11
d) Mitox	5×10^{-7}	30 ± 7 , n=10	32 ± 10 , n=10
3) Vinca-Alkaloide			
a) VCR	3×10^{-5}	30 ± 9 , n=10	37 ± 12 , n=10
b) VBL	$2,5 \times 10^{-5}$	33 ± 12 , n= 9	40 ± 15 , n= 9
c) VDS	2×10^{-5}	23 ± 8 , n=12	33 ± 9 , n=12
4) Alkylantien			
a) IFO	6×10^{-3}	29 ± 10 , n=13	31 ± 10 , n=13
b) 4-OH-CYCLO	1×10^{-4}	30 ± 12 , n=11	30 ± 15 , n=11
c) DTIC	7×10^{-4}	27 ± 10 , n=10	32 ± 11 , n=10
5) Anders zytostatisch wirksame Substanzen			
a) VP 16-213	$2,3 \times 10^{-6}$	34 ± 10 , n=11	37 ± 12 , n= 9
b) DDP	$1,7 \times 10^{-4}$	32 ± 10 , n= 9	37 ± 12 , n= 9

* In diesen Fällen wurde keine Hemmung, sondern eine geringe Stimulierung des Nukleosideinbaus gemessen (siehe Wirkungsmechanismus Abb. 2-4, S. 21-22).

90 μ l Zellsuspension und 10 μ l des jeweiligen Zytostatikums in verschiedenen Konzentrationen wurden unter Standardbedingungen für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Danach wurden die Zellsuspensionen für weitere 60 Minuten bei 37°C in Gegenwart von 0,1 μ Ci 3 H-dTR bzw. 3 H-dUR/100 μ l Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt.

Die Tabelle gibt diejenige Konzentration eines Zytostatikums im Testansatz wieder, bei der die Hemmung des Einbaus der Radionuklide dTR bzw. dUR in die DNS 20-40% beträgt, im Vergleich zu einer Kontrolle, der unter sonst gleichen Bedingungen anstatt eines Zytostatikums 0,9% NaCl zugesetzt wurde. Um die Reproduzierbarkeit dieses geringen Hemmeffektes zu überprüfen, wurden die gleichen Versuche mehrfach durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Versuche.

Die Abb. 20 bis 36 (S. 39-47) stellen für die einzelnen Zytostatika die konzentrationsabhängige Hemmung des Einbaus von ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR in die DNS der LS2-Zellen dar. Für jedes Zytostatikum wurde die zunächst ermittelte Dosiswirkungskurve dargestellt. Die anschließend ermittelte und in wiederholten Versuchen getestete Grenzkonzentration jedes Zytostatikums mit jeweiligem Streubereich wurde ebenfalls eingezeichnet. Bei den Zytostatika 5-FU, 5-FdUR und MTX aus der Gruppe der Antimetabolite wurde nur der Einbau des radioaktiv markierten dUR durch die zytostatische Wirkung gehemmt. Der Einbau des ^3H -dTR erfolgte bei diesen Zytostatika unbehindert, teilweise sogar verstärkt (siehe Wirkungsmechanismus 5-FU, 5-FdUR, MTX, S. 21-22). ARA-C, ebenfalls ein Pyrimidinanalogon, hemmte dagegen in gleichen Maßen den ^3H -dTR und ^3H -dUR Einbau in die DNS der LS2-Zellen. Für 15 der untersuchten Medikamente konnte eine deutliche zytostatische Wirkung auf die DNS-Synthese der LS2-Zellen nachgewiesen werden. Dies äußerte sich bei einer entsprechenden Konzentration des jeweiligen Medikaments in einer fast vollständigen Hemmung des Einbaus der radioaktiv markierten Nukleoside in die DNS. Zu diesen Medikamenten zählen das 5-FU, 5-FdUR, MTX, ARA-C, Dauno, ADM, 4'-EA, Mitox, VCR, VBL, VDS, IFO, 4-OH-CYCLO, DTIC und VP 16-213. Für diese Zytostatika konnten Dosiswirkungskurven mit einem Wirkungsspektrum von zytostatisch unwirksam, über schwach zytostatisch wirksam (Grenzkonzentration) bis zu stark zytostatisch wirksam gezeichnet werden. DDP zeigte in diesem Versuchssystem keine ausgeprägte zytostatische Wirkung. Hier waren in vivo nicht erreichbare, sehr hohe Konzentrationen nötig, um eine

schwache Hemmung des Nukleosideinbaus zu bewirken. Obwohl die L-ASP speziell bei Leukämien (akuter Lymphoblastenleukämie) eingesetzt wird, zeigte sie in diesem Versuchssystem (permanent wachsende, menschliche Lymphoblastenkultur) fast keine zytostatische Wirkung, selbst bei sehr hohen Konzentrationen. Dieses Medikament wurde nicht weiter in den Hyperthermie-Experimenten untersucht.

Tabelle 1 (S. 48) faßt die ermittelten Grenzkonzentrationen der untersuchten Medikamente zusammen. Durch noch feinere Konzentrationsabstufungen als in den Dosiswirkungskurven (Abb. 20-36, S. 39-47) wurde dazu für jedes Zytostatikum diejenige Konzentration ermittelt, bei der die Hemmung des Nukleosideinbaus 20 bis 40% betrug im Vergleich zu einer Kontrolle, der anstatt eines Medikaments physiologische Kochsalzlösung zugesetzt wurde. Dieser relativ geringe Hemmeffekt des Nukleosideinbaus wurde in wiederholten Versuchen auf seine Reproduzierbarkeit überprüft.

Zusammenfassend konnten in diesen Abschnitt mit Ausnahme der L-ASP für alle untersuchten Zytostatika Grenzkonzentrationen ermittelt werden. Als Grenzkonzentration eines Medikamentes wurde diejenige Konzentration definiert, die bei 37°C den Nukleosideinbau in die DNS um 20 bis 40% hemmte. Die schwache zytostatische Wirkung der ermittelten Grenzkonzentrationen sollte im Folgenden unter hyperthermen Bedingungen untersucht werden.

3.3. Einfluß verschiedener Zytostatika auf die Hemmung der DNS-Synthese von LS2-Zellen unter hyperthermen Bedingungen.

Um zu überprüfen, ob hypertherme Temperaturen die zytostatische Wirkung der Medikamente auf die DNS-Synthese beeinflussen, wurde der ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR-Einbau in die DNS von LS2-Zellen nach Zugabe der Medikamente in ihrer Grenzkonzentration (siehe Tabelle 1, S. 48) im Temperaturbereich von 38 bis $42,5^{\circ}\text{C}$ untersucht. Es sollte geprüft werden, ob sich diese relativ schwachen zytostatischen Wirkungen (Hemmung des ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR-Einbaus um 20 bis 40%) durch Inkubation bei hyperthermen Temperaturen in stärkere zytostatische Wirkungen steigern lassen. Im Bereich von 38 bis 41°C war die DNS-Synthese der LS2-Zellen bei 30 minütiger Vorinkubation nicht durch die Hitze beeinträchtigt (siehe Abb. 19, S. 34). Daher wäre eine verstärkte zytostatische Wirkung, welche sich in einer verminderten DNS-Synthese äußert, in diesem Temperaturbereich auf die Hyperthermie-Einwirkung zurückzuführen. Im Temperaturbereich von 42 bis $42,5^{\circ}\text{C}$ bewirkt die Hitze allein schon einen Rückgang des Einbaus der radioaktiv markierten Nukleoside auf 40 bis 50%. Daher ist in diesem Bereich eine Abgrenzung der verstärkten zytostatischen Wirkung der Medikamente gegen über den Hitzeschäden nur eingeschränkt möglich.

Unter Standardbedingungen (siehe 2.2.2.4., S. 30) wurden Zellsuspensionen mit den Zytostatika in ihrer jeweiligen Grenzkonzentration (siehe Tabelle 1, S. 56) 30 Minuten bei hyperthermen Temperaturen vorinkubiert. Danach wurde die DNS für 60 Minuten mar-

kiert. Um den Einfluß der Hyperthermiedauer zu überprüfen, wurden zwei verschiedene Markierungstemperaturen gewählt, 37°C (d.h. insgesamt 30 Minuten Hyperthermie-Einwirkung) bzw. die jeweilige hypertherme Temperatur (d.h. insgesamt 90 Minuten Hyperthermie-Einwirkung). Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt. Bei allen Hyperthermie-Experimenten wurde eine Kontrolle-1, die unter sonst gleichen Bedingungen aber konstant bei 37°C inkubiert wurde, mitgeführt. Durch diese Kontrolle-1 wurde die jeweilige Grenzkonzentration der Zytostatika ständig überprüft. Durch eine ebenfalls stets mitgeführte Kontrolle-2, die unter denselben hyperthermen Bedingungen aber mit physiologischer Kochsalzlösung anstatt eines Medikaments inkubiert wurde, konnte ständig die Temperatursensitivität überwacht werden. Tabelle 2 (S.53) gibt die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kontrolle-2 wieder.

Die Abb. 37 bis 52 (S. 54-69) zeigen für jedes Medikament in seiner Grenzkonzentration den temperaturabhängigen Einbau von Radionukliden in die DNS von LS2-Zellen im Temperaturbereich von 38 bis $42,5^{\circ}\text{C}$. Diese Einbauraten sind immer im Vergleich zu den Einbauraten der Kontrolle-2 dargestellt. Um den Einfluß der Hyperthermie auf die Zytostatikawirkung zu verdeutlichen, wurden Steigungsgeraden (siehe S. 79) in dem Temperaturbereich eingezeichnet, in dem die Medikamente verstärkt zytostatisch wirksam sind. Vergleichend dazu wurde ebenfalls für die Kontrolle-2 im entsprechenden Temperaturbereich eine Steigungsgerade eingezeichnet. Die später ermittelten TVF (Temperatur-Verstärkungs-Faktoren) sind ebenfalls in den folgenden Abbildungen erhalten.

Tabelle 2 : Temperaturabhängiger Einbau von ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR in die DNS der Kontrolle-2

30 Min. Hyperthermie (Δcpm , $\bar{x} \pm s$)			90 Min. Hyperthermie (Δcpm , $\bar{x} \pm s$)		
37 °C	dTR	3031 $\pm$ 238, n = 12	*		
	dUR	2707 $\pm$ 245, n = 12			
38 °C	dTR	3151 $\pm$ 281, n = 8		dTR	3218 $\pm$ 209, n = 8
	dUR	2848 $\pm$ 177, n = 8		dUR	2921 $\pm$ 181, n = 8
39 °C	dTR	3137 $\pm$ 234, n = 7		dTR	3224 $\pm$ 241, n = 8
	dUR	2865 $\pm$ 379, n = 8		dUR	2915 $\pm$ 311, n = 7
40 °C	dTR	2908 $\pm$ 251, n = 8		dTR	2919 $\pm$ 303, n = 7
	dUR	2816 $\pm$ 285, n = 8		dUR	2747 $\pm$ 267, n = 7
41 °C	dTR	2914 $\pm$ 284, n = 8		dTR	2961 $\pm$ 344, n = 8
	dUR	2609 $\pm$ 196, n = 8		dUR	2531 $\pm$ 193, n = 8
42 °C	dTR	1893 $\pm$ 217, n = 8		dTR	1264 $\pm$ 205, n = 8
	dUR	1369 $\pm$ 103, n = 8		dUR	1169 $\pm$ 217, n = 8
42,5 °C	dTR	1369 $\pm$ 183, n = 8		dTR	1049 $\pm$ 123, n = 8
	dUR	1059 $\pm$ 235, n = 8		dUR	786 $\pm$ 108, n = 8

* In diesem Fall wurden die Zellen 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

90 μl Zellsuspension und 10 μl 0,9% NaCl wurden unter Standardbedingungen bei einer hyperthermen Temperatur (38 - 42,5 °C) für 30 Min. vorinkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für weitere 60 Minuten bei 37 °C bzw. den jeweiligen hyperthermen Bedingungen in Gegenwart von 0,1 μCi ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR/100 μl Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt. Die Reproduzierbarkeit dieser Werte wurde durch wiederholte, getrennt ausgeführte Versuche überprüft.

Die Tabelle gibt den temperaturabhängigen Einbau von ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR in die DNS der NaCl-Kontrolle (Kontrolle-2) im Temperaturbereich von 38 bis 42,5 °C wieder. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der wiederholt ermittelten Kontrollwerte.

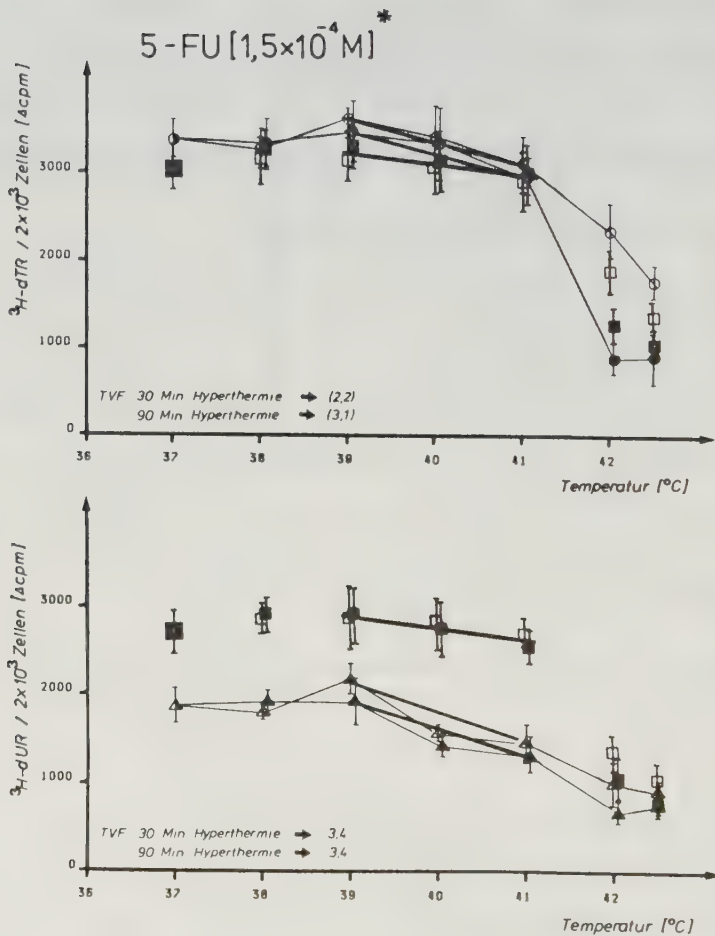


Abb. 37

Methodik und Legende siehe Seite 70.

* In diesem Fall wurde keine Hemmung des dTR-Einbaus in die DNS sondern eine geringe Stimulierung des dTR-Einbaus gemessen (bedingt durch den Wirkungsmechanismus, siehe Abb. 2, S. 21).

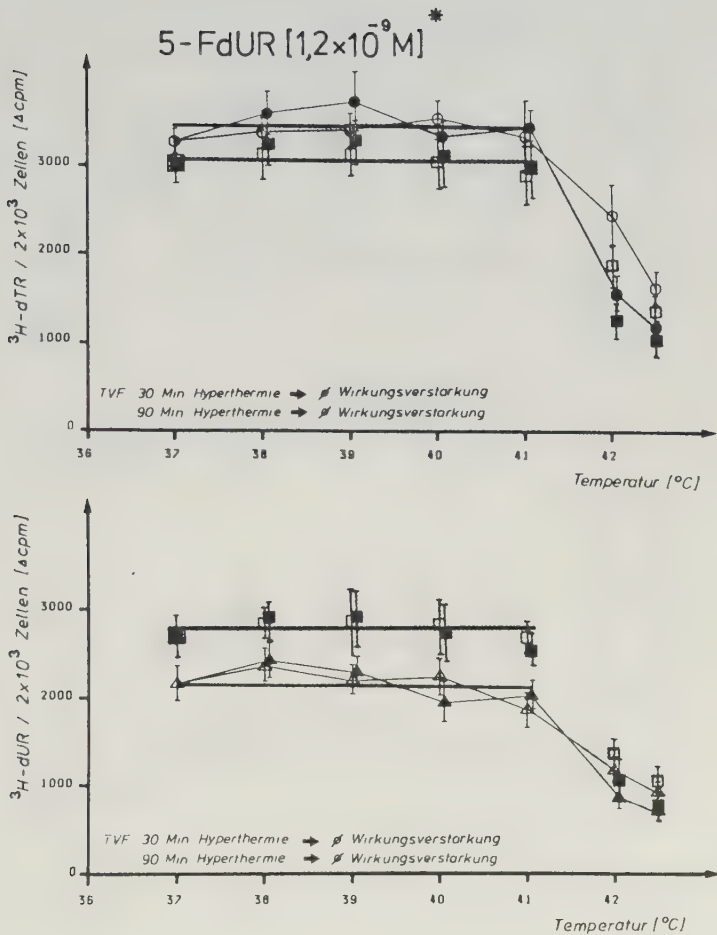


Abb. 38

Methodik und Legende siehe Seite 70.

Da 5-FdUR durch Hyperthermie nicht in seiner zytostatischen Wirkung verstärkt wurde, konnte in diesem Fall keine Steigungsgerade eingezeichnet werden. Die eingezeichnete Gerade hat die Steigung null.

* In diesem Fall wurde keine Hemmung des dTR-Einbaus in die DNS sondern eine geringe Stimulierung des dTR-Einbaus gemessen (bedingt durch den Wirkungsmechanismus, siehe Abb. 3, S. 21).

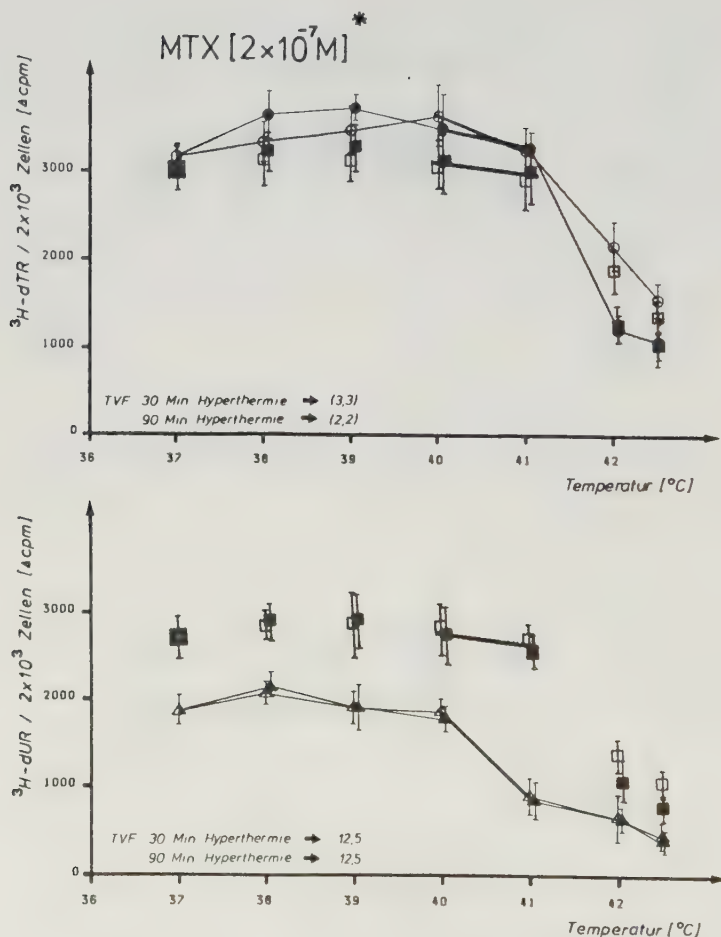


Abb. 39

Methodik und Legende siehe Seite 70.

In diesem Fall wurde keine Hemmung des dTR-Einbaus in die DNS sondern eine geringe Stimulierung des dTR-Einbaus gemessen (bedingt durch den Wirkungsmechanismus, siehe Abb. 4, S. 22).

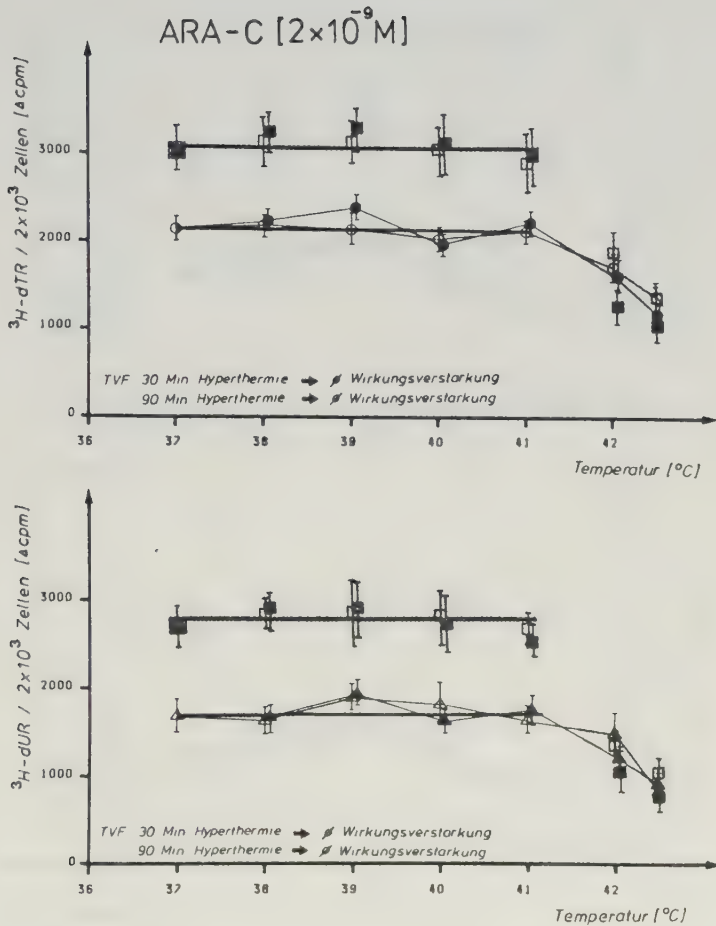


Abb. 40

Methodik und Legende siehe Seite 70.

Da ARA-C durch Hyperthermie nicht in seiner zytostatischen Wirkung verstärkt wurde, konnte in diesem Fall keine Steigungsgerade eingezeichnet werden. Die eingezeichnete Gerade hat die Steigung null.

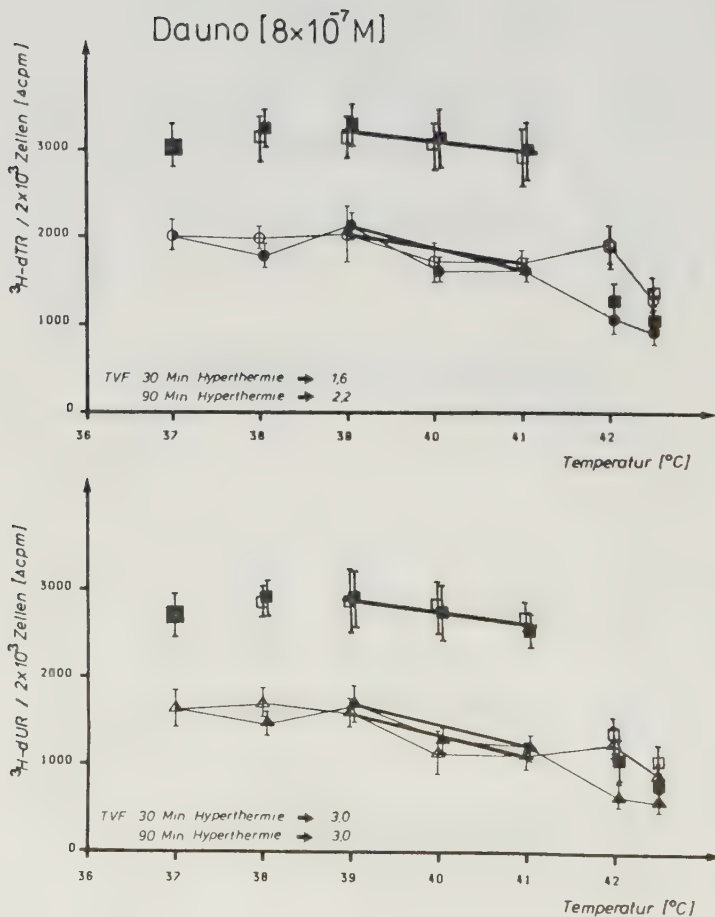


Abb. 41

Methodik und Legende siehe Seite 70.

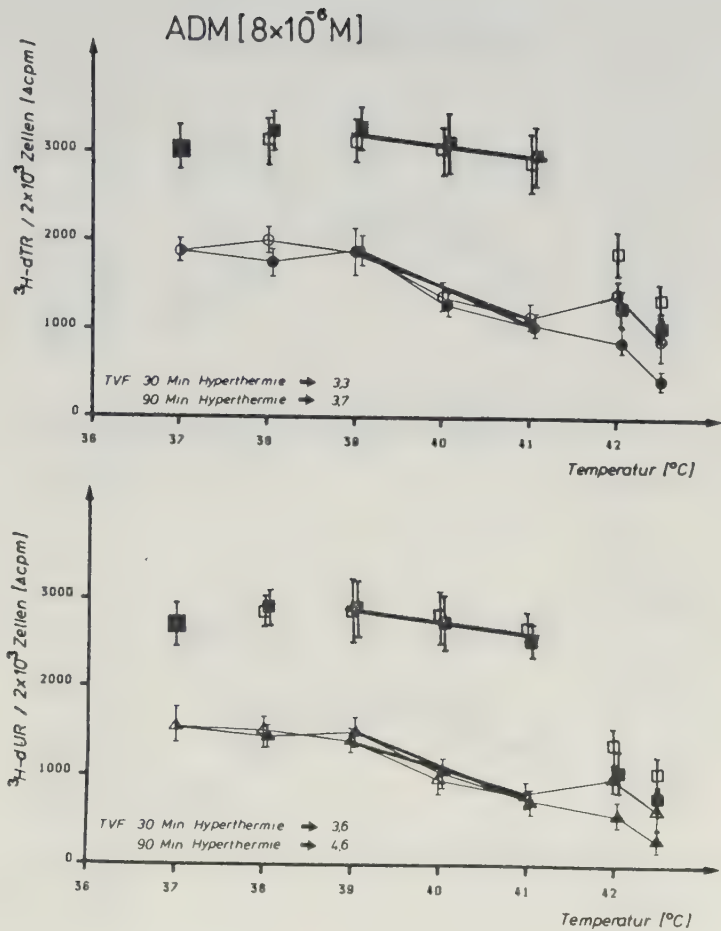


Abb. 42

Methodik und Legende siehe Seite 70.

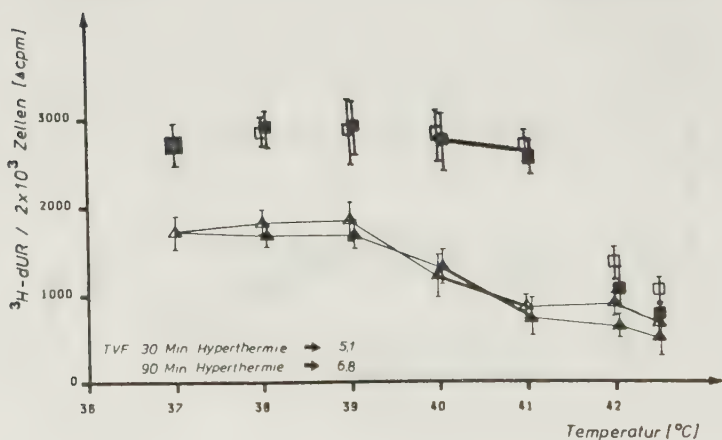
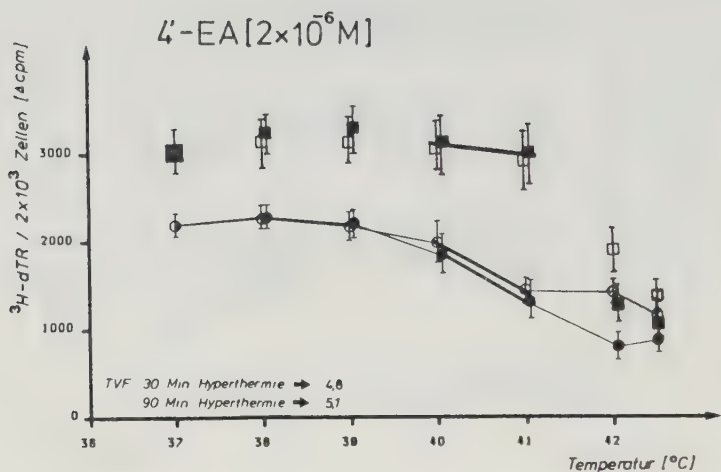


Abb. 43

Methodik und Legende siehe Seite 70.

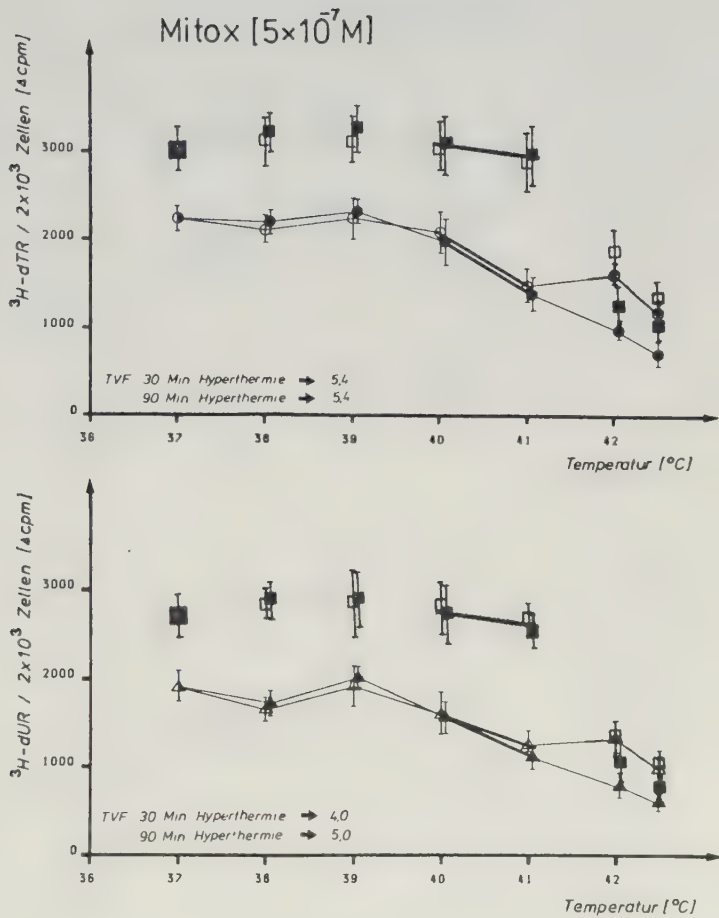


Abb. 44

Methodik und Legende siehe Seite 70.

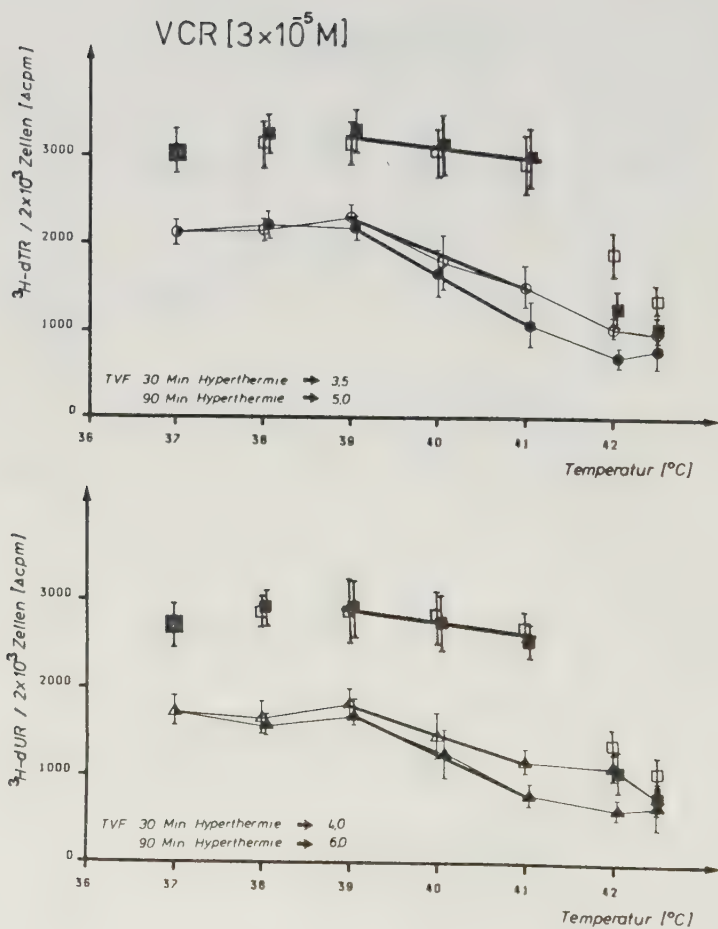


Abb. 45

Methodik und Legende siehe Seite 70.

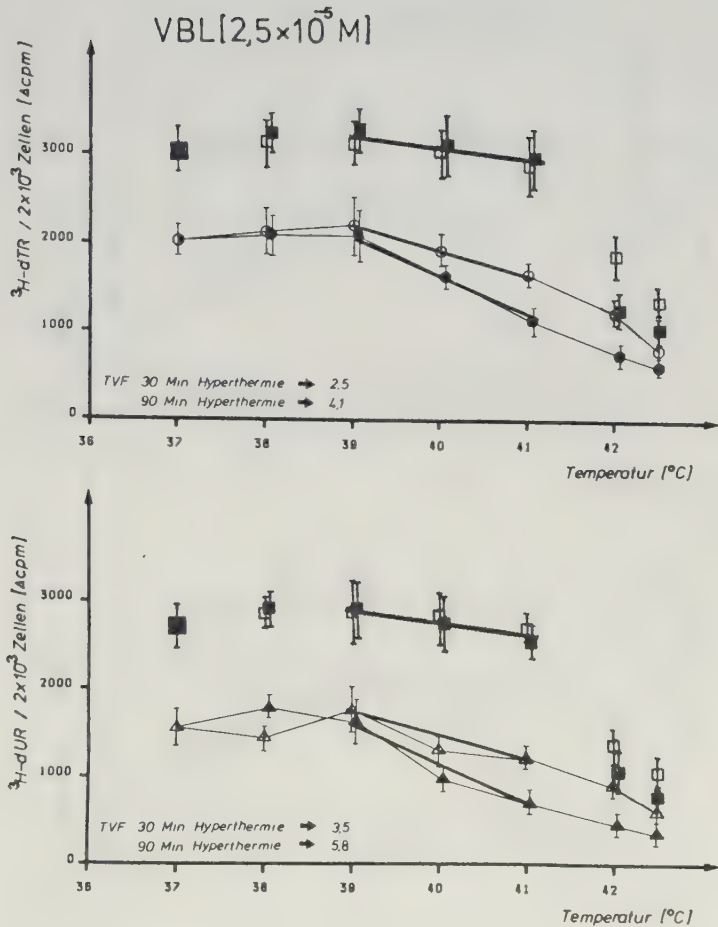


Abb. 46

Methodik und Legende siehe Seite 70.

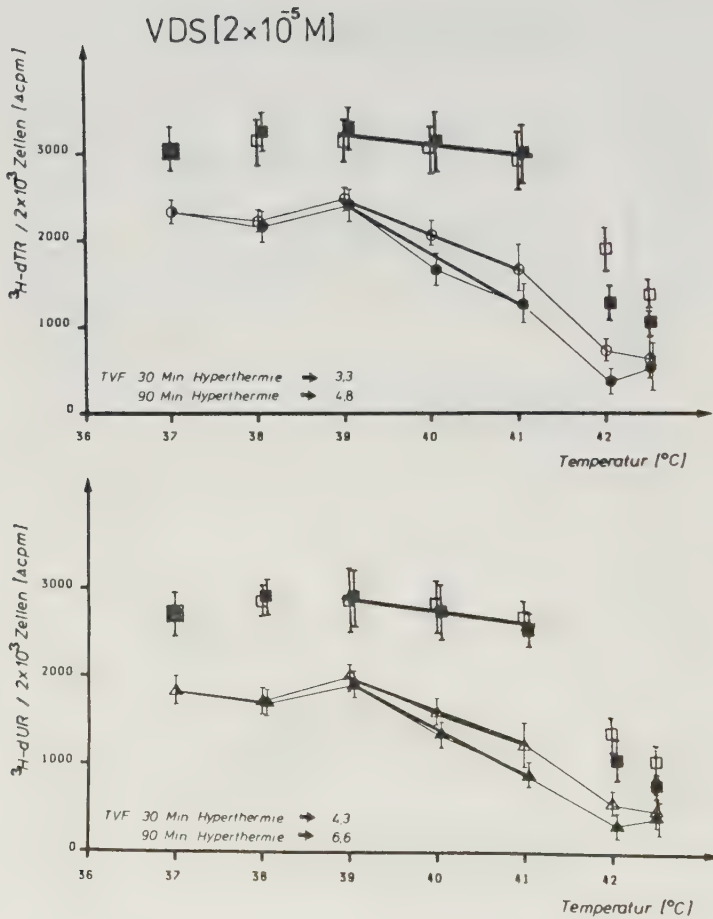


Abb. 47

Methodik und Legende siehe Seite 70.

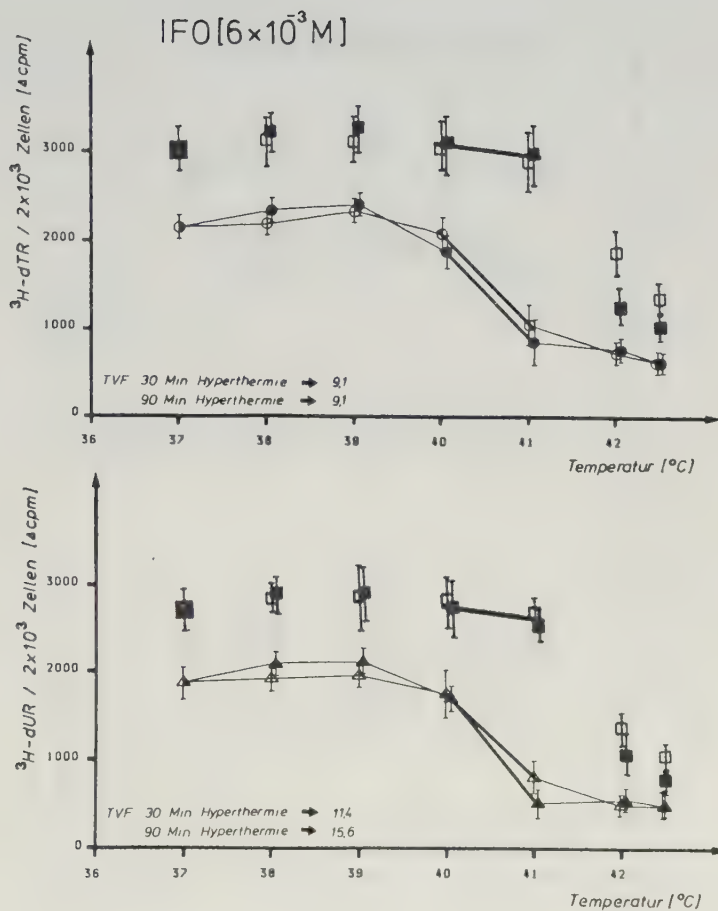


Abb. 48

Methodik und Legende siehe Seite 70.

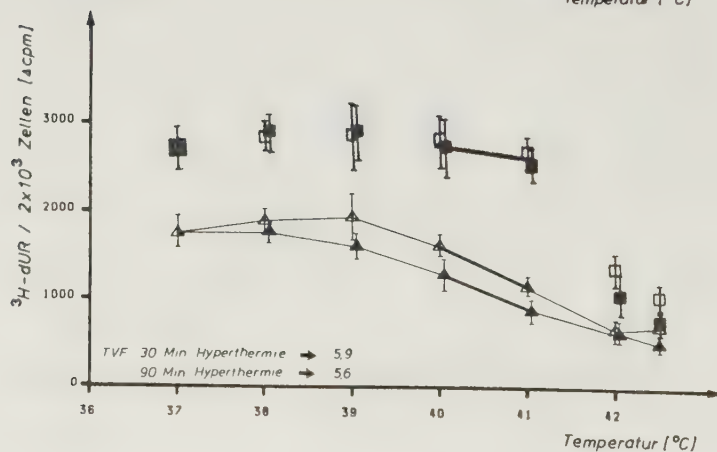
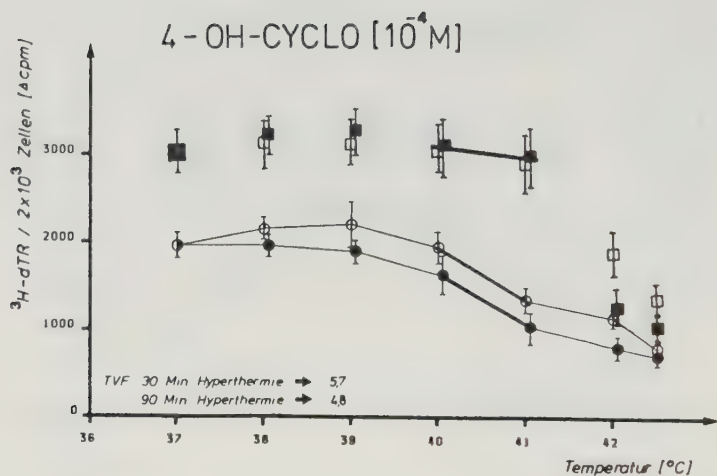


Abb. 49

Methodik und Legende siehe Seite 70.

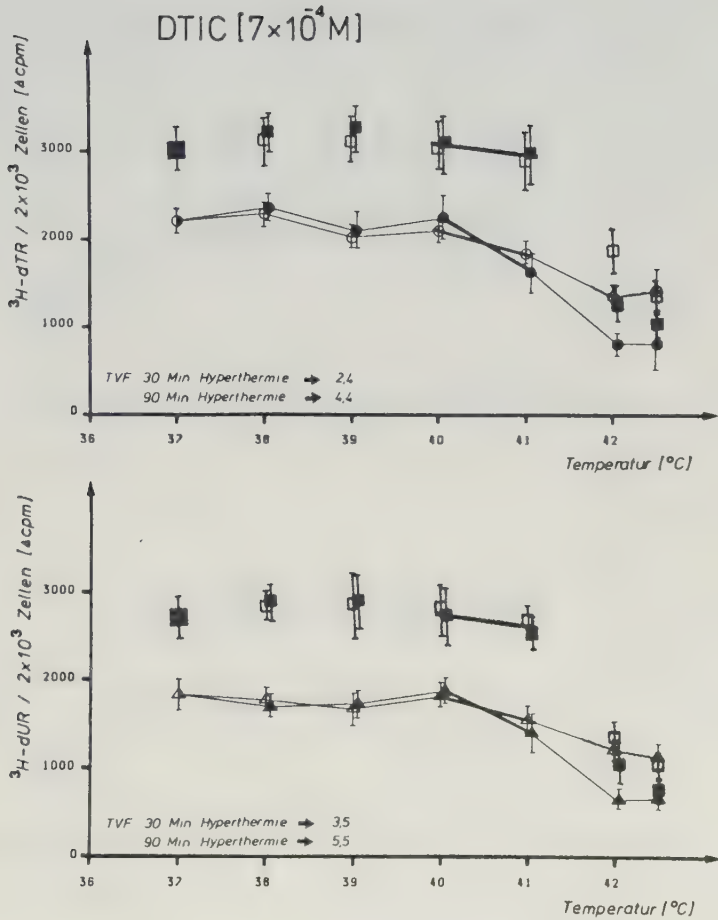


Abb. 50

Methodik und Legende siehe Seite 70.

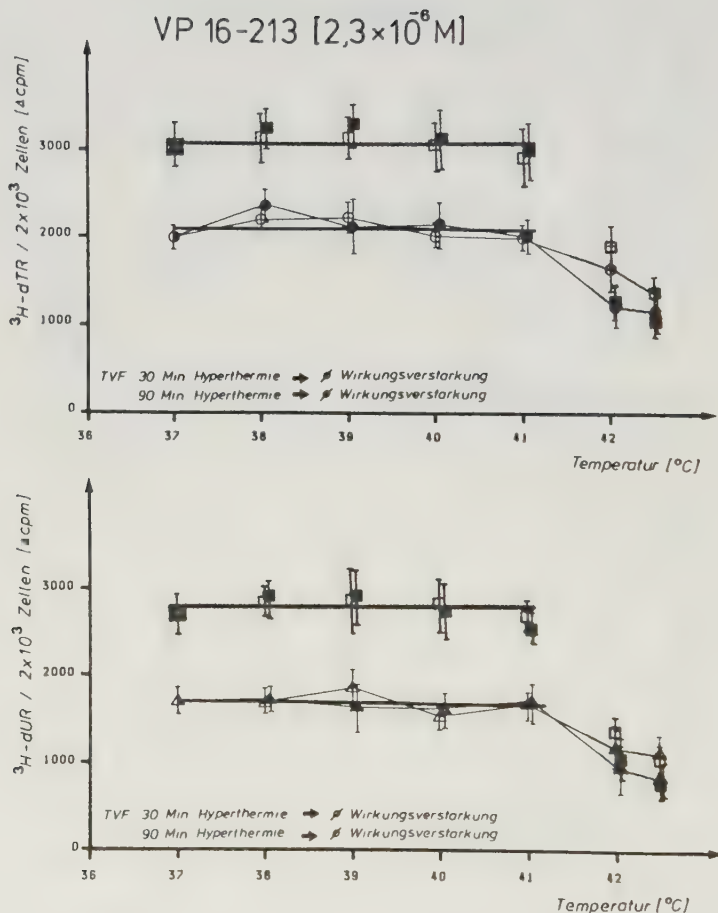


Abb. 51

Methodik und Legende siehe Seite 70.

Da VP 16-213 durch Hyperthermie nicht in seiner zytostatischen Wirkung verstärkt wurde, konnte in diesem Fall keine Steigungsgerade eingezeichnet werden. Die Steigung der eingezeichneten Gerade ist null.

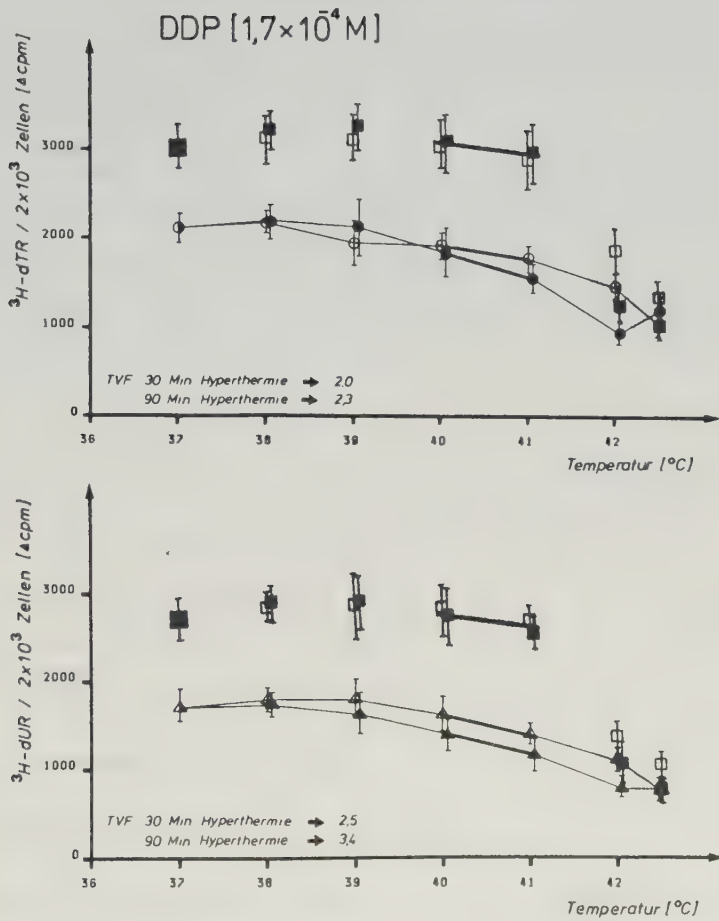


Abb. 52

Methodik und Legende siehe Seite 70.

Abb. 37 - 52 : Einfluß verschiedener Zytostatika auf die DNS-Synthese von LS2-Zellen unter hyperthermen Bedingungen.

90 μ l Zellsuspension und 10 μ l eines Zytostatikums wurden unter Standardbedingungen für 30 Minuten bei einer hyperthermen Temperatur (38-42,5°C) vorinkubiert. Danach wurde die Zellsuspension für weitere 60 Minuten bei 37°C bzw. den jeweiligen hyperthermen Bedingungen in Gegenwart von 0,1 μ Ci 3 H-dTR bzw. 3 H-dUR/100 μ l Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt. Die einzelnen Werte für die verschiedenen Temperaturen wurden alle in getrennten Versuchen bestimmt. Die Radioaktivität in Δ cpm/100 μ l Zellsuspension ist in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Der Einfluß jedes Zytostatikums ist im Vergleich zur Kontrolle-2 (siehe Tab.2, S. 53) dargestellt. Für die Zytostatika wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier bis sechs Versuchen angegeben.

Zytostatikum : Nukleosideinbau in die DNS nach Zugabe von 3 H-dTR

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei entsprechender hyperthermer Bedingung.

 Vorinkubation bei 37°C, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

Zytostatikum : Nukleosideinbau in die DNS nach Zugabe von 3 H-dUR

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei entsprechender hyperthermer Bedingung.

 Vorinkubation bei 37°C, Einbau der Radioaktivität bei 37°C

Kontrolle-2 (NaCl) : Nukleosideinbau in die DNS nach Zugabe 3 H-dTR bzw. 3 H-dUR

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

 Hypertherme Vorinkubation, Einbau der Radioaktivität bei entsprechender hyperthermer Bedingung.

 Vorinkubation bei 37°C, Einbau der Radioaktivität bei 37°C.

Steigungsgerade (siehe S. 71). Diese Geraden wurden bei den Medikamenten im verstärkt zytostatisch wirksamen Bereich und verglichen im entsprechenden Temperaturbereich der Kontrolle-2 eingezeichnet.

TVF : Temperatur-Verstärkungs-Faktor (siehe Tabelle 3, S. 72).

Auf Grund der unterschiedlichen Kurvenverläufe der temperaturabhängigen Zytostatikawirkung können die Medikamente in vier Typen eingeteilt werden. Um die Zuordnungen der einzelnen Medikamente in diese Gruppen zu erleichtern und um die Medikamente untereinander vergleichen zu können, wurden die in Abb. 37 bis 52 (S. 54-69) dargestellten Kurvenverläufe der temperaturabhängigen Zytostatikawirkung im Temperaturbereich von 38 bis 41°C weiter ausgewertet. Dazu wurden Steigungsgeraden durch die im Vergleich zu 37°C verstärkt zytostatisch wirksamen Temperaturbereiche gelegt. Als zytostatische Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie wurde eine Zunahme der Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS um mehr als 15% (= max. Standardabweichung in Tab. 1, S. 48) verglichen mit der zytostatischen Wirkung der Grenzkonzentration bei 37°C definiert. Es wurde je eine Gerade durch die dTR- und je eine Gerade durch die dUR-Werte bei 30 bzw. 90 minütiger Hyperthermie-Einwirkung gelegt. Vergleichend dazu wurde je eine Gerade durch die entsprechenden dTR- bzw. dUR-Werte der Kontrolle-2 gelegt. Diese Steigungsgeraden dienten als Grundlage für die Berechnung der Temperatur-Verstärkungs-Faktoren (TVF). Bei diesen TVF handelt es sich um Quozienten aus den Steigungen der jeweiligen Gerade eines Zytostatikums im verstärkt zytostatisch wirksamen Temperaturbereich und der entsprechenden Steigung der Kontrolle-2.

Tabelle 3 (S. 72) gibt die verstärkte Wirkung der einzelnen Zytostatika im Temperaturbereich bis 41°C anhand dieser TVF wieder.

Tabelle 3 : Wirkungsverstärkung der verschiedenen Zytostatika durch Hyperthermie.

Medikament	TVF bei 30 Min. Hyperthermie		TVF bei 90 Min. Hyperthermie	
	3_{H-dTR}	3_{H-dUR}	3_{H-dTR}	3_{H-dUR}
Typ 1 : sehr gute Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie				
IFO	9,1	11,4	9,1	15,6
MTX	(3,3)	12,5	(2,2)	12,5
Typ 2 : gute Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie				
4-QH-CYCLO	5,7	5,9	4,8	5,6
4"-BA	4,8	5,1	5,1	6,8
Mitox	5,4	4,0	5,4	5,0
VDS	3,3	4,3	4,8	6,6
VCR	3,5	4,0	5,0	6,0
ADM	3,3	3,6	3,7	4,6
VBL	2,3	3,4	4,1	5,8
DTIC	2,2	3,3	4,4	5,5
Typ 3 : fragliche Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie				
5-FU	(2,2)	3,4	(3,1)	3,4
Dauno	1,6	3,0	2,2	3,0
DDP	2,0	2,5	2,3	3,4
Typ 4 : keine Wirkungssteigerung durch Hyperthermie				
5-FdUR, ARA-C und VP 16-213				

Die TVF (Temperatur-Verstärkungs-Faktoren) sind aus den Abb.37-52 (S. 54-69) ermittelt worden. Es handelt sich dabei um Quozienten aus den Steigungen der jeweiligen Gerade eines Zytostatikums im verstärkt wirksamen Bereich und der Steigung der Kontrolle-2. Als verstärkte zytostatische Wirkung wurde die Zunahme der Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS um mehr als 15% (= max. Standardabweichung in Tabelle 1, S. 48), verglichen mit der zytostatischen Wirkung der Grenzkonzentration bei 37°C definiert.

Die ermittelten TVF geben die zytostatische Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie wieder. Je nach Verstärkung wurde unterteilt in :

- Typ 1 : Wirkungssteigerung sehr gut (> 50%)
 = $TVF(dTR) > 7,2 / TVF(dUR) > 10,5$
 Typ 2 : Wirkungssteigerung gut (25-50%)
 = $TVF(dTR) 2,4-7,2 / TVF(dUR) 3,5-10,5$
 Typ 3 : Wirkungssteigerung fraglich (15-25%)
 = $TVF(dTR) < 2,4 / TVF(dUR) < 3,5$
 Typ 4 : keine Wirkungssteigerung (< 15%)

Tabelle 3 (S. 72) unterscheidet bei den Zytostatika je nach Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie zwischen vier verschiedenen Typen.

Typ 1 : sehr gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie (> 50%).

Typ 2 : gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie (25-50%).

Typ 3 : fragliche Wirkungssteigerung durch Hyperthermie (15-25%).

Typ 4 : fehlende Wirkungssteigerung durch Hyperthermie (< 15%).

Die Rangfolge innerhalb eines Typs wird durch die Wirkungssteigerung bei der kürzeren Hyperthermie-Einwirkung von 30 Minuten bestimmt.

Typ 1, vertreten durch IFO und MTX, zeigt sowohl bei 30 als auch bei 90 Minuten Hyperthermie-Einwirkung eine sehr gute zytostatische Wirkungssteigerung.

Typ 2, vertreten durch 4-OH-CYCLO, 4'-EA, Mitox, VDS, VCR, ADM, VBL und DTIC zeigt bei 90 minütiger Hyperthermie-Einwirkung für alle genannten Medikamente eine gute zytostatische Wirkungssteigerung. 4-OH-CYCLO, 4'-EA und Mitox werden schon bei 30 minütiger Hyperthermie-Einwirkung gut verstärkt, die längere Hyperthermie-Einwirkung bewirkt keine weitere Steigerung. Bei den Vinca-Alkaloiden, VDS, VCR, VBL und beim DTIC fällt auf, daß ihre zytostatische Wirkungssteigerung durch die längere Hyperthermie-Einwirkung von 90 Minuten ausgeprägter ist. Das ADM zeigt eine gleichbleibend gute Wirkungssteigerung.

Für Typ 3, vertreten durch 5-FU, Dauno und DDP kann nur eine fraglich schwache Wirkungssteigerung nachgewiesen werden. An

dieser Tatsache ändert auch die längere Hyperthermie-Einwirkung nicht viel.

Typ 4, vertreten durch 5-FdUR, ARA-C und VP 16-213 zeigt keine Wirkungssteigerung durch Hyperthermie-Einwirkung.

Betrachtet man die entsprechenden Abb. 37 bis 51 (S. 54-69), so wird deutlich, daß die Wirkungssteigerung der Zytostatika bei keinem Medikament vor 39°C auftritt. Oberhalb von 39°C werden verschiedene Zytostatika in ihrer Wirkung verstärkt. Tabelle 4 (S. 75) gibt einen Überblick über die Temperaturbereiche, in denen die einzelnen Zytostatika in ihrer Wirkung verstärkt sind. Außerdem kennzeichnet die Tabelle, wie stark die Medikamente in den verschiedenen Temperaturbereichen wirken und welche Temperaturerhöhung mindestens nötig ist, um eine verstärkte zytostatische Wirkung auszulösen. Als zytostatische Wirkungssteigerung durch Hyperthermie wurde wiederum eine um mindestens 15% verstärkte Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS im Vergleich zur 37°C-Wirkung gewertet (Vergleiche Definition der Steigungsgeraden S. 71). Je nach der Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS wird in der Tabelle 4 unterschieden zwischen einer sehr guten zytostatischen Wirkungssteigerung (Wirkungsverstärkung > 50%), einer guten zytostatischen Wirkungssteigerung (Wirkungsverstärkung 25-50%), sowie zwischen einer fraglichen Wirkungssteigerung (Wirkungsverstärkung 15-25%) und keiner Wirkungssteigerung (Wirkungsverstärkung < 15%).

Tabelle 4 : Temperaturbereiche der verstärkten zytostatischen Wirkung.

Medikament	30 Min. > 39°C	90 Min. > 39°C	30 Min. > 40°C	90 Min. > 40°C
Klasse 1 : Wirkungsverstärkung > 39°C				
VCR	++	++	++	++
ADM	++	++	++	++
VBL	0	++	+	++
VDS	0	++	++	++
Klasse 2 : Wirkungsverstärkung > 40°C				
Mitox	+	+	++	++
4-OH-CYCLO	0	+	++	++
IFO	0	0	+++	+++
MTX	0	0	+++	+++
4'-EA	0	0	++	++
DTIC	0	0	+	++
Klasse 3 : fragliche bis keine Wirkungsverstärkung bis 41°C				
5-FU	+	+	+	+
Dauno	+	+	+	+
DDP	0	+	+	+
5-FdUR	0	0	0	0
ARA-C	0	0	0	0
VP 16-213	0	0	0	0

Diese Tabelle gibt einen Überblick über die Temperaturbereiche, in denen die einzelnen Zytostatika in ihrer Wirkung verstärkt sind. Die entsprechenden Temperaturbereiche wurden aus den Abb. 37-52 (S. 54-69) ermittelt. Außerdem kennzeichnet die Tabelle, wie stark die Medikamente in den verschiedenen Temperaturbereichen wirken und welche Temperaturerhöhung mindestens nötig ist, um diese verstärkte Wirkung auszulösen. Als zytostatische Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie wurde eine um mindestens 15% (= max. Standardabweichung in Tabelle 1, S. 48) verstärkte Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS im Vergleich zur 37°C-Wirkung gewertet.

Die Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS wurde im Vergleich zur 37°C-Wirkung ausgedrückt und unterteilt in :

- +++ = > 50 % Reduktion (sehr gute Wirkungssteigerung)
- ++ = 25 - 50 % Reduktion (gute Wirkungssteigerung)
- + = 15 - 25 % Reduktion (fragliche Wirkungssteigerung)
- 0 = < 15 % Reduktion (keine Wirkungssteigerung)

Tabelle 4 (S. 75) unterteilt die Medikamente in drei Klassen, je nach dem Temperaturbereich, in dem die zytostatische Wirkungssteigerung beginnt. Ausgewertet wurde der Temperaturbereich in dem die DNS-Synthese durch Hyperthermie unbeeinflusst blieb, d.h. der Bereich von 37 bis 41°C.

Klasse 1 : Wirkungsverstärkung oberhalb von 39°C.

Klasse 2 : Wirkungsverstärkung oberhalb von 40°C.

Klasse 3 : Fragliche bis keine Wirkungsverstärkung bis 41°C.

Klasse 1, dargestellt durch VCR, ADM, VBL und VDS, fängt bei Temperaturen oberhalb von 39°C an, verstärkt zu wirken. VCR und ADM sind in ihrer zytostatischen Wirkung schon nach 30 minütigem Einwirken von Temperaturen oberhalb von 39°C verstärkt, VBL und VDS erst nach 90 minütigem Einwirken dieser Temperaturen. Diese zytostatische Wirkungssteigerung wird bei allen genannten Medikamenten noch ausgeprägter, wenn sie bei Temperaturen oberhalb von 40°C inkubiert werden.

Klasse 2, dargestellt durch Mitox, 4-OH-CYCLO, IFO, MTX, 4'-EA und DTIC fängt erst bei Temperaturen oberhalb von 40°C an, verstärkt zu wirken. Mitox und 4-OH-CYCLO demonstrieren den fließenden Übergang zu Klasse 1, indem sie im Temperaturbereich oberhalb von 39°C nur fraglich verstärkt wirksam sind, dafür aber im Temperaturbereich oberhalb von 40°C eine gute Wirkungssteigerung zeigen. 4'-EA und DTIC zeigen ebenfalls eine gute, MTX und IFO sogar eine sehr gute Wirkungssteigerung im Temperaturbereich oberhalb von 40°C.

Klasse 3 faßt diejenigen Zytostatika zusammen, die im ausgewerteten Temperaturbereich nur eine fragliche oder gar keine Wirkungssteigerung durch Hyperthermie-Einwirkung zeigen. Zu dieser Gruppe gehören das 5-FU, Dauno, DDP, 5-FdUR, ARA-C und VP 16-213.

Zusammenfassend haben die Hyperthermieversuche gezeigt :

- 1.) Die schwache zytostatische Wirkung der Grenzkonzentration, definiert als diejenige Konzentration, die den Nukleosideinbau bei 37°C um 20 bis 40% hemmt, konnte bei einigen Zytostatika durch Hyperthermie-Einwirkung in eine stärkere zytostatische Wirkung überführt werden. Verschiedene Zytostatika lassen sich dabei unterschiedlich in ihrer Wirkung steigern (siehe Tab. 3, S. 72).
- 2.) Im Temperaturbereich von 37 bis 39°C findet bei keinem der untersuchten Zytostatika eine Wirkungssteigerung statt. Einige Zytostatika werden oberhalb von 39°C in ihrer Wirkung verstärkt, andere Zytostatika werden erst oberhalb von 40°C in ihrer Wirkung verstärkt (siehe Tab. 4. S. 75).

3.4. Temperaturstabilität der Zytostatika.

Der Temperaturbereich oberhalb von 41°C ist auf Grund des Hitzeschadens, der den Zellen zugefügt wird, nur eingeschränkt beurteilbar. Betrachtet man aber in diesem Temperaturbereich auf den Abb. 37 bis 52 (S. 54-69) die zytostatische Wirkung im Ver-

gleich zum alleinigen Hitzeschaden, sichtbar an der eingezeichneten Kurve der Kontrolle-2, so ist erkennbar, daß beim MTX, ADM, VCR, VBL, VDS, IF0 und 4-OH-CYCLO der Einbau der radioaktiv markierten Nukleoside in die DNS deutlich stärker gehemmt ist, als bei der Kontrollkurve. Dies bedeutet, daß diese Medikamente auch oberhalb von 41°C noch zytostatisch wirksam sind.

Beim 5-FU, 5-FdUR, ARA-C, Dauno, 4'-EA, Mitox, DTIC, DDP und VP 16-213 dagegen ist die zytostatische Wirkung im Vergleich zur Kontrollkurve in diesem Temperaturbereich nicht mehr so ausgeprägt, sodaß die zytostatische Wirkung dieser Medikamente nicht gegenüber der Hemmung des Nukleosideinbaus auf Grund des Hitzeschadens abgegrenzt werden kann.

Eine mögliche Ursache für die verringerte zytostatische Wirkung einiger Medikamente in diesem Temperaturbereich könnte deren Instabilität bei Temperaturen oberhalb von 41°C sein. Da der Temperaturbereich oberhalb von 41°C sehr viel Bedeutung im Rahmen der Hyperthermie-Behandlung bei Patienten hat, wurden die in den Hyperthermie-Experimenten getesteten Zytostatika in einem unabhängigen experimentellen Ansatz auf ihre Stabilität im Temperaturbereich von 39 bis 43°C untersucht. Zunächst wurde dazu für jedes Zytostatikum diejenige Konzentration ermittelt, bei der die Hemmung des Nukleosideinbaus ca. 50% (40-60%) betrug. Verdünnungen wurden dabei in üblicher Weise mit 0,9% NaCl hergestellt. Diese Zytostatikallösungen wurden dann für 90 Minuten ohne Kulturzellen bei 39°C , 41°C , 43°C bzw. 0°C inkubiert. Danach wurde die Zytostatikallösung unter Standardbedingungen (siehe 2.2.2.4., S. 30)

zu LS2-Zellsuspensionen dazugegeben. Diese Medikamenten-Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert, dann wurde die DNS für 60 Minuten bei 37°C mit ^3H -dTR bzw. ^3H -dUR markiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt.

Tabelle 5 (S. 80) gibt die Stabilität der verschiedenen Zytostatika im Temperaturbereich von 39 bis 43°C wieder. Zusätzlich sind die jeweiligen Konzentrationen der verschiedenen Zytostatika angegeben, die zu einer 40 bis 60%igen Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS führten.

Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, daß mit Ausnahme des VP 16-213 alle Zytostatika bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten im Temperaturbereich von 39 bis 43°C stabil blieben. VP 16-213 zeigte nach 90 minütiger Inkubation bei 43°C eine verringerte zytostatische Wirkung.

Die Versuche zur Ermittlung der Temperaturstabilität der Zytostatika haben demonstriert, daß mit Ausnahme des VP 16-213 alle in den Hyperthermie-Experimenten untersuchten Zytostatika im hyperthermen Temperaturbereich bis 43°C stabil blieben (siehe Tabelle 5, S. 80).

Tabelle 5 : Temperaturstabilität der Zytostatika

Medikament	50%ige Hemmkonzentration (mol/l)	39°C	41°C	43°C
1) Antimetabolite				
a) 5-FU	$3,6 \times 10^{-4}$	+	+	+
b) 5-FdUR	$2,5 \times 10^{-9}$	+	+	+
c) MTX	4×10^{-7}	+	+	+
d) ARA-C	6×10^{-9}	+	+	+
2) Anthrazykline und Anthrachinone				
a) Dauno	$1,2 \times 10^{-6}$	+	+	+
b) ADM	$1,2 \times 10^{-5}$	+	+	+
c) 4'-EA	5×10^{-6}	+	+	+
d) Mitox	1×10^{-6}	+	+	+
3) Vinca-Alkaloide				
a) VCR	4×10^{-5}	+	+	+
b) VBL	$3,6 \times 10^{-5}$	+	+	+
c) VDS	4×10^{-5}	+	+	+
4) Alkylantien				
a) IFO	7×10^{-3}	+	+	+
b) 4-OH-CYCLO	2×10^{-4}	+	+	+
c) DTIC	9×10^{-4}	+	+	+
5) Anders zytostatisch wirksame Substanzen				
*a) DDP	$1,7 \times 10^{-4}$	+	+	+
b) VP 16- 213	5×10^{-6}	+	+	-

* In diesem Fall wurde trotz sehr hoher Konzentration nur eine 30-40%ige Hemmung des Nukleosideinbaus erreicht.

Diese Tabelle gibt die Stabilität der verschiedenen Zytostatika bei den Temperaturen 39°C, 41°C und 43°C wieder. Zusätzlich sind die jeweiligen Konzentrationen der Zytostatika angegeben, die zu einer ca. 50%igen (40 - 60%) Hemmung des Nukleosideinbaus in die DNS führen.

Die jeweils 50%ige Hemmkonzentration eines Zytostatikums wurde zunächst für 90 Minuten ohne Kulturzellen bei 39°C, 41°C, 43°C bzw. 0°C inkubiert. Danach wurden die Zytostatikalösungen unter Standardbedingungen zu LS2-Zellsuspensionen dazugegeben. Diese Medikamenten-Zellsuspension wurde für 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert, dann wurde die DNS für weitere 60 Minuten bei 37°C in Gegenwart von 0,1 µCi/100µl Zellsuspension inkubiert. Anschließend wurde die TCA fällbare Radioaktivität bestimmt.

+ Temperaturstabil, d.h. ca. 50%ige Hemmung des Nukleosideinbaus nach 90 minütiger Inkubation auf Eis und bei den jeweiligen Temperaturen (39/41/43°C).

- Temperaturlabil, d.h. < 40%ige Hemmung des Nukleosideinbaus nach 90 minütiger Inkubation bei den jeweiligen Temperaturen (39/41/43°C).

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Medikamente daraufhin untersucht, ob sich ihre zytostatische Wirkung auf eine exponentiell wachsende menschliche Lymphoblastenkultur (LS2-Kultur) durch Hyperthermie steigern läßt. Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung dieser Medikamente in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie wurde dabei speziell nach Zytostatika gesucht, die voraussichtlich nur im stark erhitzten Tumorgewebe ($> 39/40^{\circ}\text{C}$) eine gesteigerte zytostatische Wirkung entwickeln. Bei diesen Zytostatika würde es, wenn sie im Rahmen dieser Therapie eingesetzt werden, zu keiner zusätzlichen Verstärkung unerwünschter Nebenwirkungen auf Gewebe wie z.B. Knochenmark, Herz, Leber und Nieren kommen.

Die 16 untersuchten Zytostatika aus den Gruppen der Antimetabolite, Anthrazykline und Anthrachinone, Vinca-Alkaloide und anders zytostatisch wirksamen Substanzen konnten auf Grund einer unterschiedlichen Wirkungssteigerung durch Hyperthermie in vier Gruppen eingeteilt werden (siehe Tabelle 3, S. 72). IFO und MTX zeigten eine sehr gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie, 4-OH-CYCLO, VDS, VCR, VBL, ADM, 4'-EA, Mitox und DTIC eine gute Steigerung. Dagegen wurden 5-FU, Dauno und DDP nur fraglich und 5-FdUR, ARA-C und VP 16-213 gar nicht durch Hyperthermie in ihrer Wirkung gesteigert.

Für VP 16-213 konnte nachgewiesen werden, daß es bei höheren Temperaturen (43°C) instabil und dementsprechend weniger wirksam

war. Alle anderen Zytostatika blieben bis 43°C stabil (siehe Tabelle 5, S. 80).

Bezüglich der Temperaturerhöhung, die notwendig ist, um einen verstärkten zytostatischen Effekt bei den einzelnen Zytostatika auszulösen, konnte demonstriert werden, daß bei keinem der untersuchten Medikamente eine verstärkte zytostatische Wirkung unterhalb von 39°C auftrat (siehe Tabelle 4, S. 75). Insofern würden sich alle Zytostatika, die in diesem Versuchssystem eine sehr gute bzw. gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie zeigten, für eine weitere Untersuchung in klinischen Studien in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie anbieten, ohne, daß bei einer begleitenden Erhöhung der Körperkerntemperatur auf maximal 39°C mit einer Zunahme der systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden muß. VP 16-213 eignet sich auf Grund seiner Instabilität bei höheren Temperaturen nicht für den Einsatz in der regionalen Thermochemotherapie.

Viele der in der LS2-Kultur untersuchten Zytostatika sind auch schon in tierischen Zelllinien unter hyperthermen Bedingungen untersucht worden (4, 21, 24-30, 33-37, 39, 68). Die Zytostatikawirkung wurde in den Tierzellkulturen meist anhand des klonogenen Wachstums nach der Thermochemotherapie beurteilt und nicht wie bei der LS2-Kultur anhand des Einbaus radioaktiv markierter Nukleoside in die DNS. Als Hyperthermiebereich wurden in diesen Arbeiten überwiegend Temperaturen oberhalb von 40°C gewählt. Aus diesen Experimenten ist deshalb nur ersichtlich, welche Zytostatika bei höheren Temperaturen (ca. 41 bis 45°C) im Vergleich zu

37°C verstärkt wirken, aber die Frage, ab welcher Temperatur diese Medikamente anfangen, verstärkt zu wirken bzw. ob sie bei Anwendung in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie auch schwach erwärmtes, gesundes Gewebe verstärkt schädigen würden, wird nicht beantwortet. Andererseits konnten in der LS2-Kultur wegen des Hitzeschadens der Zellen die Wirkung der Zytostatika nur bis 42,5°C beurteilt werden, sodaß Wirkungsverstärkungen, die erst oberhalb dieser Temperaturen auftreten, in den LS2-Kultursversuchen nicht erfaßt wurden. Trotz diverser Unterschiede in den Versuchsbedingungen und Auswertungen wurden überwiegend übereinstimmende Ergebnisse bezüglich der durch Hyperthermie gesteigerten zytostatischen Wirkung einiger Medikamente aus der LS2-Kultur und den Tierzellkulturen ermittelt.

Im Rahmen der Hyperthermieerforschung stellt das Anthrazyklinderivat ADM eines der am besten untersuchten Zytostatika dar. Dieses Zytostatikum zeigte ebenso wie das strukturverwandte 4'-EA und das Anthrachinonderivat Mitox in der LS2-Kultur eine gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie oberhalb von 39 bzw. 40°C (siehe Tabelle 4, S. 75) G.M. Hahn et al. wiesen in vitro in einer HA-1-Zellkultur ebenfalls eine verstärkte zytostatische Wirkung für ADM nach (26). Einen ähnlichen Effekt konnten sie außerdem für ein anderes Antibiotikum, das Bleomycin (BLEO), demonstrieren. Die zytostatische Wirkung wurde bei diesen Experimenten anhand des klonogenen Wachstums nach der Thermochemotherapie beurteilt. ADM und BLEO zeigten bei 41°C eine schwache zytostatische Wirkungsverstärkung, die für ADM bei 42°C, für BLEO bei

43°C in eine ausgeprägte zytostatische Wirkungssteigerung überführt werden konnte. Hahn et al. konnten außerdem den selben Effekt für beide Zytostatika in vivo in einem soliden Tumorsystem (EMT-6 Mammassarkom der Maus) nachweisen.

Die Wirkungssteigerung des BLEO durch Hyperthermie scheint teilweise auf gehemmte Reparaturmechanismen zurückzuführen zu sein (26). Bei 37°C können Zellen einen gewissen Anteil des BLEO-Schadens wieder reparieren. Bei höheren Temperaturen scheinen diese Reparaturmechanismen gehemmt zu werden, sodaß das BLEO dann seine zytostatische Wirkung voll entfalten kann. Für ADM konnten solche Reparaturmechanismen nicht nachgewiesen werden. Eine Ursache für die verstärkte zytostatische Wirkung des ADM könnte die gesteigerte Permeabilität von Plasmamembranen bei höheren Temperaturen sein (26, 27, 50, 94, 95). Bei 43°C konnte zytofluorographisch intrazellulär eine wesentlich höhere ADM-Konzentration nachgewiesen werden als bei 37°C (26). Als zusätzliche Ursache für die verstärkte intrazelluläre Anreicherung von ADM bei höheren Temperaturen wird die Hemmung eines aktiven Transports, der Zytostatika aus den Zellen wieder herauspumpt, diskutiert (83). Dieser durch Hitze gehemmte aktive Transport könnte auch eine Erklärung für die Beobachtung sein, daß gewisse Zytostatikaresistenzen durch Hyperthermie aufgehoben werden konnten (20, 31); denn in speziellen Zellkulturen, die unter einer Therapie resistent gegen Zytostatika wie ADM, VCR oder VBL wurden, konnten bei den Tochterzellen modifizierte Gene gefunden werden, die bewirkten, daß das betreffende Zytostatikum so schnell wie möglich wieder aus der Zelle herausgepumpt wurde (42).

Das Vinca-Alkaloid VDS und das Anthrachinonderivat Mitox sind Medikamente, die in der LS2-Kultur eine gute zytostatische Wirkungssteigerung durch Hyperthermie zeigten (siehe Tabelle 3, S. 72). VDS wird dabei oberhalb von 39°C , Mitox oberhalb von 40°C in seiner zytostatischen Wirkung verstärkt (siehe Tabelle 4, S. 75). T.S. Herman untersuchte VDS, Mitox und Amsacrin (AMSA) unter hyperthermen Bedingungen in einer CHO-Zellkultur (33). Die zytostatische Wirkung wurde durch Bestimmung des klonogenen Wachstums nach der Thermochemotherapie beurteilt. In diesem Experiment konnte ebenfalls demonstriert werden, daß Mitox und VDS bei hyperthermen Temperaturen eine stärkere zytostatische Wirkung entwickeln als bei 37°C . In diesem Versuch wurde bei $42,4^{\circ}\text{C}$ die Wirkung des VDS additiv, die des Mitox synergistisch gesteigert. In der LS2-Kultur wurden zusätzlich die Vincaalkaloide VCR und VBL untersucht. Ihre Wirkungssteigerung durch Hyperthermie entsprach weitgehend der des VDS (siehe Tabelle 3, S. 72).

Für AMSA konnte T.S. Herman trotz nachgewiesener Stabilität bei $42,4^{\circ}\text{C}$ keine zytostatische Wirkungssteigerung durch Hyperthermie demonstrieren; im Gegenteil, das Medikament zeigte bei 37°C eine ausgeprägtere zytostatische Wirkung als bei $42,4^{\circ}\text{C}$ (33). Ein ähnliches Ergebnis ist auch für ARA-C, ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite, beschrieben worden (54). Dieses Medikament fiel bei den Untersuchungen in der LS2-Kultur ebenfalls dadurch auf, daß sich seine zytostatische Wirkung nicht durch

Hyperthermie beeinflussen ließ. Beim ARA-C wird vermutet, daß Hyperthermie den intrazellulären Metabolismus dieses Zytostatikums stört. 5-FdUR, ebenfalls ein Zytostatikum aus der Gruppe der Antimetabolite, welches in der LS2-Kultur durch Hyperthermie nicht in seiner Wirkung gesteigert werden konnte, zeigte in einer L1210 Leukämiezelllinie (Maus) überhaupt keine zytostatische Wirkung unabhängig davon, ob alleine appliziert oder in Kombination mit Hyperthermie (21). Ein weiterer Strukturverwandter des ARA-C und 5-FdUR, das 5-FU, konnte in der LS2-Kultur auch nur fraglich durch Hyperthermie in seiner Wirkung gesteigert werden (siehe Tabelle 3, S. 72).

Ein anderer Antimetabolit, das MTX, wurde von G.M. Hahn in vitro im Rahmen eines Experiments über die pH-Abhängigkeit einiger Medikamente untersucht (29). MTX zeigte in diesem Versuch erstaunlicherweise weder bei 37°C noch bei 43°C eine ausgeprägte zytostatische Wirkung auf CHO-Zellen. Dies widerspricht dem Verhalten von MTX in der LS2-Kultur. Dort war das MTX eines der beiden Medikamente, die am ausgeprägtesten durch Hyperthermie in ihrer Wirkung gesteigert wurden. Das andere Zytostatikum, welches ebenfalls eine sehr gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie in der LS2-Kultur zeigte, ist das IFO (siehe Tabelle 3, S. 72). Dieses Zytostatikum scheint in anderen Zellkulturen noch nicht unter hyperthermen Bedingungen untersucht worden zu sein. Ein weiteres Alkylanz, das Cyclophosphamid, zeigte in seiner aktivierten Form als 4-OH-CYCLO in der LS2-Kultur eine gute zytostatische Wirkungssteigerung durch Hyperthermie.

Das Zytostatikum DDP ist als verstärkt wirksam in einer HA-1-Zellkultur bei hyperthermen Temperaturen (42°C) beschrieben worden (25). In der LS2-Kultur war DDP nur in in vivo nicht erreichbaren, sehr hohen Konzentrationen wirksam und wurde auch nur fraglich durch Hyperthermie in seiner Wirkung gesiegt. Eine Ursache für die verminderte zytostatische Wirkung des DDP in der LS2-Kultur könnte sein, daß es sich bei dieser Kultur um eine exponentiell wachsende Kultur handelt, während DDP z.B. bei 37°C vermehrt auf nicht proliferierende Zellen wirkt (25).

VP 16-213, ein Podophyllotoxinderivat, scheint ebenfalls in anderen Zellkulturen noch nicht unter hyperthermen Bedingungen untersucht worden zu sein. VP 16-213 zeigte in der LS2-Kultur keine durch Hyperthermie verstärkte Wirkung. Nach 90 minütiger Vorinkubation bei 43°C in 0,9%iger NaCl übte VP 16-213 kaum noch eine zytostatische Wirkung auf LS2-Zellen bei 37°C aus. Wegen dieser chemischen Thermolabilität sollte VP 16-213 nicht bei Hyperthermieverfahren eingesetzt werden, in denen Temperaturen über 42°C erreicht werden.

Für zahlreiche Zytostatika konnte mittlerweile in unterschiedlichsten Zellkulturen gezeigt werden, daß sie bei bestimmten hyperthermen Temperaturen eine ausgeprägtere zytostatische Wirkung zeigen als bei 37°C (4, 24-30, 33-37, 39, 68). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich demonstriert, daß es unter diesen Zytostatika solche gibt, die voraussichtlich bei der Anwen-

derung im Rahmen einer regionalen Thermochemotherapie keine verstärkte zytostatische Wirkung auf leicht erwärmtes gesundes Gewebe zeigen werden und insofern auch nicht mit einer Zunahme der systemischen Nebenwirkungen bei diesen Zytostatika gerechnet werden muß. Eine durch Hyperthermie verstärkte zytostatische Wirkung, die zunächst in vitro demonstriert wurde, konnte in vielen Fällen für entsprechende Zytostatika auch in Tierexperimenten nachgewiesen werden (1, 11, 32, 52, 53, 55, 60, 62, 74, 82, 84). Für einige dieser Zytostatika sind sogar die Mechanismen bekannt, die die entsprechende zytostatische Wirkungssteigerung auslösen. Es ist zu wünschen, daß diese vielversprechenden Ergebnisse aus in vitro und in vivo Versuchen bei der klinischen Anwendung einer systemischen Chemotherapie in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie bestätigt werden. Vieles deutet darauf hin, daß extrazelluläre Milieuveränderungen im Tumorgewebe die zytostatische Wirkung verschiedener Medikamente in vivo noch zusätzlich verstärken können. Die regionale Hyperthermie bietet die Möglichkeit, Zytostatika im Tumorgewebe zur verstärkten Wirkung zu bringen. Falls der Einsatz der regionalen Thermochemotherapie nicht durch unerwünschte Nebenwirkungen limitiert wird, kann sie in der Behandlung regionaler maligner Prozesse ein beachtliches tumorzerstörendes Potential zur Wirkung bringen.

5. AUSBLICK

Es erscheint sinnvoll, die bisher mit LS2-Zellen erhobenen Befunde in Zukunft noch durch einige Untersuchungen zu ergänzen. Diese sollen vor allem der klinischen Relevanz dienen.

Diverse Modifikationen sind bereits in in vitro Experimenten mit tierischen Zelllinien durchgeführt worden, um die vielfältigen Möglichkeiten zur zytostatischen Wirkungssteigerung gewisser Medikamente bzw. Verminderung unerwünschter Nebenwirkungen optimal ausnützen zu können.

Es wurde z.B. festgestellt, daß durch sogenanntes "step-down-heating" die zytostatische Wirkung einiger Medikamente gesteigert werden kann (36). Exponentiell wachsende RIF-Tumorzellen der Maus wurden mit bestimmten Konzentrationen von Doxorubicin, Bleomycin und Cisplatin zunächst für 10 Minuten auf 45°C erhitzt, anschließend bei $41,5^{\circ}\text{C}$ weiter inkubiert. Die zytostatische Wirkung der entsprechenden Medikamente in den Zellkulturen, die mit "step-down-heating" behandelt worden waren, wurde dann mit der zytostatischen Wirkung verglichen, die dieselben Medikamente in denselben Konzentrationen und der selben Inkubationszeit nur bei kontinuierlicher $41,5^{\circ}\text{C}$ -Einwirkung zeigten. Die Ergebnisse zeigten, daß die zytostatische Wirkung von Doxorubicin und Bleomycin, nicht jedoch Cisplatin, durch das "step-down-heating" ausgeprägter war, als bei alleiniger $41,5^{\circ}\text{C}$ -Einwirkung.

Untersuchungen über die pH-Abhängigkeit der zytostatischen Wirkung verschiedener Medikamente ergaben, daß einige Zytostatika verstärkt im sauren Bereich wirksam sind (29). Hahn et al. konnten in CHO-Zellkulturen zeigen, daß Amphotericin B, Bleomycin und BCNU, nicht aber Methotrexat, eine bedeutend stärkere zytostatische Wirkung bei hyperthermen Temperaturen in einem azidischen Medium entwickeln, als bei denselben hyperthermen Temperaturen in einem neutralen oder alkalischen Medium.

Die Möglichkeit, gesundes Gewebe durch Abkühlung auf niedrigere Temperaturen vor unerwünschten Zytostatikanebenwirkungen zu schützen, ist von A.M. Herman et al. untersucht worden (34, 35). In einer CHO-Zelllinie konnte gezeigt werden, daß Medikamente wie Doxorubicin, Cisplatin, Bleomycin und BCNU, die bei hyperthermen Temperaturen verstärkt zytostatisch wirksam sind, bei hypothermen Temperaturen (22 bis 32°C) eine verminderte zytostatische Wirkung zeigen. Wurden die Zytostatika nach der hypothermen Vorbehandlung in der CHO-Zellkultur auf 42,4 bzw. 43°C erhitzt, konnte kein Wirkungsverlust durch die Vorbehandlung nachgewiesen werden; im Gegenteil, Doxorubicin zeigte nach dieser Vorbehandlung sogar eine noch ausgeprägtere zytostatische Wirkung. Falls diese Beobachtung in vivo bestätigt werden kann, könnte gesundes Gewebe bei der regionalen Hyperthermie durch Abkühlung auf hypotherme Temperaturen vor unerwünschten zytostatischen Nebenwirkungen geschützt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden 16 in der klinischen Praxis häufig verwendete Zytostatika in vitro systematisch daraufhin untersucht, ob sich ihre zytostatische Wirkung durch Hyperthermie steigern läßt. In Hinblick auf eine mögliche Anwendung dieser Medikamente in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie wurde dabei speziell nach solchen Zytostatika gesucht, die voraussichtlich nur lokal im stark erhitzten Tumorgewebe eine gesteigerte zytostatische Wirkung entwickeln, ohne, daß bei einer begleitenden Erhöhung der Körperkerntemperatur auf maximal 39°C mit einer Zunahme der systemischen Nebenwirkungen gerechnet werden muß.

Die zytostatische Wirkung wurde anhand des Einbaus radioaktiv markierter Nukleoside in die DNS einer exponentiell wachsenden, menschlichen Lymphoblastenkultur beurteilt.

Zunächst wurde für jedes Zytostatikum eine bei 37°C schwach zytostatisch wirksame Konzentration (Grenzkonzentration) ermittelt. Anschließend wurde jedes Medikament in entsprechender Grenzkonzentration im hyperthermen Temperaturbereich von 38 bis $42,5^{\circ}\text{C}$ untersucht. Dabei wurde überprüft, ob sich die schwache zytostatische Wirkung der Grenzkonzentration bei 37°C durch Hyperthermie in eine ausgeprägtere zytostatische Wirkung steigern läßt.

Auf Grund der unterschiedlichen Wirkungssteigerung durch Hyperthermie konnten die Zytostatika in vier Gruppen eingeteilt wer-

den. Ifosfamid und Methotrexat zeigten dabei eine im Vergleich zu den anderen Zytostatika herausragende, sehr gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie. Für 4-OH-Cyclophosphamid, Vindesin, Vincristinsulfat, Vinblastin, Doxorubicin, 4'-Epi-Doxorubicin, Mitoxantron und Dacarbazin konnte eine gute Steigerung nachgewiesen werden. Dagegen wurden 5-Fluorouracil, Daunorubicin und Cisplatin nur fraglich, Cytarabin, Etoposid und 5-Fluorouracildeoxyribosid gar nicht durch Hyperthermie in ihrer Wirkung gesteigert.

Bezüglich der Temperaturerhöhung, die nötig ist, um ein Zytostatikum in seiner Wirkung zu verstärken, konnte nachgewiesen werden, daß bei keinem der untersuchten Medikamente eine Wirkungssteigerung vor 39°C auftrat. Die meisten Zytostatika fingen entweder oberhalb von 39°C oder erst oberhalb von 40°C an, in ihrer Wirkung verstärkt zu werden. Insofern eignen sich alle Zytostatika, die in diesem Versuchssystem eine sehr gute bzw. gute Wirkungssteigerung durch Hyperthermie gezeigt haben, für weitere Untersuchungen in klinischen Studien in Kombination mit einer regionalen Hyperthermie. Bei diesen Zytostatika ist mit einer lokalen Wirkungsverstärkung durch die regionale Hyperthermie zu rechnen, ohne, daß es dabei zu einer Verstärkung systemischer Nebenwirkungen kommt.

Untersuchungen zur Thermostabilität der Zytostatika zeigten, daß mit Ausnahme von Etoposid, welches bei 43°C in wässriger Lösung instabil und damit weniger wirksam wurde, alle untersuchten Zytostatika im hyperthermen Temperaturbereich bis 43°C stabil blieben.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alberts, D.S., Peng, Y-M., Chen, G.H-S., Moon, T.E., Cetas, T.C., Hoeschele, J.D. (1980). Therapeutic Synergism of Hyperthermia : cis-Platin in a Mouse Tumor Model. J. Natl. Cancer Inst. 65, 455-461.
2. Anderson, K.C., Cohen, G.I., Garnick, M.B. (1982). Phase II Trial of Mitoxantrone. Cancer Treat. Rep. 66, 1929-1931.
3. Barlogie, B., Corry, P.M., Yip, E., Lippmann, L., Khalil, K., Tenczynski, T.F., Reilly, E., Lawson, R., Dosik, G., Rigor, B., Hankenson, R., Freireich, E.J. (1979). Total-Body Hyperthermia with and without Chemotherapy for Advanced Human Neoplasms. Cancer Res. 39, 1481-1489.
4. Bhuyan, B.K. (1979). Kinetics of Cell Kill by Hyperthermia. Cancer Res. 39, 2277-2284.
5. Bicher, H.I., Hetzel, F.W., Sandhu, T.S., Frinak, S., Vaupel, P., O'Hara, M.S., O'Brain, T. (1980). Effects of Hyperthermia on Normal and Tumor Environment. Radiology 137, 523-530.
6. Bolognino, G. (1908). Maligne Geschwülste und erysipelatöse Infektion. Z. Krebsforsch. 6, 261-263.
7. Bull, J.M., Lees, D., Schuette, W., Whang-Peng, J., Smith, R., Bynum, G., Atkinson, E.R., Gottdiener, J.S., Gralnick, H.R., Shawker, T.H., DeVita, V.T. (1979). Whole Body Hyperthermia : A Phase-I Trial of a Potential Adjuvant to Chemotherapy. Ann. Intern. Med. 90, 317-323.
8. Busch, W. (1866). Über den Einfluß welchen heftigere Erysipele zuweilen auf organisierte Neubildungen ausüben. Verh. Naturh. Preuss. Rhein. Westphal. 23, 28-30.
9. Christen, H.R. (1975). Grundlagen organischer Chemie. Verlag Diesterweg/ Salle. 3. Auflage. S.236-238.
10. Corry, P.M., Robinson, S., Getz, S. (1977). Hyperthermic Effects on DNA Repair Mechanisms. Radiology 123, 475-482.
11. Dahl, O., Mella, O. (1983). Effect of Timing and Sequence of Hyperthermia and Cyclophosphamide on a Neurogenic Rat Tumor (BT4A) in Vivo. Cancer 52, 983-987.
12. Dewey, W.C. (1984). Interaction of Heat with Radiation and Chemotherapy. Cancer Res. (Suppl.) 44, 4714s-4720s.
13. Dewey, W.C., Hopwood, L.E., Sapareto, S.A., Gerwick, M.S. and L.E. (1977). Cellular Response to Combinations of Hyperthermia and Radiation. Radiology 123, 463-474.

14. Dickson, J.A., Suzangar, M. (1974). In Vitro-in Vivo Studies on the Susceptibility of the Solid Yoshida Sarcoma to Drugs and Hyperthermia (42°). Cancer Res. 34, 1263-1274.
15. Dudar, T.E., Rakesh, K.J. (1984). Differential Response of Normal and Tumor Microcirculation to Hyperthermia. Cancer Res. 44, 605-612.
16. Fairman, H.D. (1982). The Treatment of Head and Neck Carcinoma with Adriamycin and Bleomycin Using Adjuvant Hyperthermia. J. Laryngol. Otol. 96, 251-263.
17. Flentje, M., Flentje, D., Sapareto, S.A. (1984). Differential Effect of Hyperthermia on Bone Marrow Normal Colony-forming Units and AKR and L1210 Leukemia Stem Cells. Cancer Res. 44, 1761-1766.
18. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. (1980). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut Mannheim/Wien/Zürich, 3. Auflage, S. 565-571.
19. Ghussen, F., Nagel, K., Müller, J.M., Groth, W., Stützer, H. (1985). Die regionale Extremitätenperfusion bei Patienten mit malignen Melanomen. Tumor Diagn. Ther. 6, 74-78.
20. Gillette, E.L. (1984). Clinical Use of Thermal Enhancement and Therapeutic Gain for Hyperthermia with Radiation or Drugs. Cancer Res. (Suppl.) 44, 4836s-4841s.
21. Giovannella, B.C., Lohman, W.A., Heidelberger, C. (1970). Effects of Elevated Temperatures and Drugs on the Viability of L1210 Leukemia Cells. Cancer Res. 30, 1623-1631.
22. Goetze, O. (1932). Örtliche Überwärmung gesunder und kranker Gliedmassen. Dtsch. Z. Chir. 234, 577-578.
23. Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Gilman A. (1980). The Pharmacological Basis of Therapeutics. Macmillan Publishing Co., Inc., USA., 6. Auflage, S. 1249-1305.
24. Hahn, G.M. (1974). Metabolic Aspects of the Role of Hyperthermia in Mammalian Cell Inactivation and Their Possible Relevance to Cancer Treatment. Cancer Res. 34, 3117-3123.
25. Hahn, G.M. (1979). Potential for Therapy of Drugs and Hyperthermia. Cancer Res. 39, 2264-2268.
26. Hahn, G.M., Braun, J., Har-Kedar, J. (1975). Thermochemotherapy: Synergism Between Hyperthermia (42-43°) and Adriamycin (or Bleomycin) in Mammalian Cell Inactivation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 937-940.

27. Hahn, G.M., Li, G.C. (1982). Interactions of Hyperthermia and Drugs : Treatment and Probes. Natl. Cancer Inst. Monogr. 61, 317-323.
28. Hahn, G.M., Li, G.C., Shiu, E.C. (1977). Interaction of Amphotericin B and 43 Hyperthermia. Cancer Res. 37, 761-764.
29. Hahn, G.M., Shiu, E.C. (1983). Effect of pH and Elevated Temperatures on the Cytotoxicity of Some Chemotherapeutic Agents on Chinese Hamster Cells in Vitro. Cancer Res. 43, 5785-5791.
30. Hahn, G.M., Strände, D.P. (1976). Cytotoxic Effects of Hyperthermia and Adriamycin on Chinese Hamster Cells. J. Natl. Cancer Inst. 57, 1063-1067.
31. Hall, E.J., Roizin-Towle, L.R. (1984). Biological Effects of Heat. Cancer Res. (Suppl.) 44, 4708s-4713s.
32. Hazan, G., Ben-Hur, E., Yerushalmi, A. (1981). Synergism Between Hyperthermia and Cyclophosphamide in Vivo : The Effect of Dose Fraction. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 17, 681-684.
33. Herman, T.S. (1983). Effect of Temperature on the Cytotoxicity of Vindesine, Amsacrine, and Mitoxantrone. Cancer Treat. Rep. 67, 1019-1022.
34. Herman, T.S. (1983). Temperature Dependence of Adriamycin, cis-Diammine-dichloroplatinum, Bleomycin, and 1,3-Bis(2-chloro-ethyl)-1-nitrosurea Cytotoxicity. Cancer Res. 43, 517-520.
35. Herman, T.S., Baustian, A.M., Kundrat, M.A. (1981). Enhancement of Hyperthermia Induced Lethality and Modulation of Adriamycin (ADR) Cytotoxicity by Cooling. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 22, 221.
36. Herman, T.S., Henle, K.J., Nagle, W.A., Moss, A.J., Monson, T.P. (1984). Effect of Step-Down Heating on the Cytotoxicity of Adriamycin, Bleomycin, and cis-Diamminedichloroplatinum. Cancer Res. 44, 1823-1826.
37. Herman, T.S., Sweets, C.C., White, D.M., Gerner, E.W. (1982). Effect of Heating on Lethality Due to Hyperthermia and Selected Chemotherapeutic Drugs. J. Natl. Cancer Inst. 68, 487-491.
38. Herman, T.S., Zukoski, F., Anderson, R.M., Hutter, J.J., Blitt, C.D. et al. (1982). Whole-Body Hyperthermia and Chemotherapy for Treatment of Patients with Advanced, Refractory Malignancies. Cancer Treat. Rep. 66, 259-267.

39. Johnson, H.A., Pavelec, M. (1973). Thermal Enhancement of Thio-TEPA Cytotoxicity. J. Natl. Cancer Inst. 50, 903-908.
40. Kang, M., Song, C.W., Levitt, S.H. (1980). Role of Vascular Function in Response of Tumors in Vivo to Hyperthermia. Cancer Res. 40, 1130-1135.
41. Kim, J.H., Hahn, E.W. (1979). Clinical and Biological Studies of Localized Hyperthermia. Cancer Res. 39, 2258-2261.
42. Kolata, G. (1986). Why Do Cancer Cells Resist Drugs ? Science 231, 220-221.
43. Kowal, C.D., Bertino, J.R. (1979). Possible Benefits of Hyperthermia to Chemotherapy. Cancer Res. 39, 2285-2289.
44. Kummer, D. (1971). Cytostatica-Sensibilitätstest solider maligner Tumoren in vitro zur gezielten kombinierten operativen und chemotherapeutischen Behandlung des Krebsleidens. Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. 76, 124-139.
45. Kubota, Y., Shuin, T., Miura, T., Nishimura, R., Fukushima, S., Takai, S. (1984). Treatment of Bladder Cancer With a Combination of Hyperthermia, Radiation and Bleomycin. Cancer 53, 199-202.
46. Kühl, M. (1985). Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus und zur Pharmakokinetik von Etoposid (= VP16-213 = Vepesid), Dissertationsschrift, München.
47. Lange, J., Zänker, K.S., Sievert, J.R., Eisler, K., Landauer, B., Kolb, E., Blümel, G., Remy, W. (1983). Extrakorporal induzierte Ganzkörperhyperthermie bei konventionell inkurablen Malignompatienten. Dtsch. med. Wochenschr. 108, 504-509.
48. Lehninger, A.L. (1975). Biochemistry, Worth Publishers, Inc., USA, 2. Auflage S. 729-747.
49. Li, G.C. (1984). Thermal Biology and Physiology in Clinical Hyperthermia : Current Status and Future Needs. Cancer Res. (Suppl.) 44, 4886-4893s.
50. Lin, P.S., Wallach, D.F.H., Tsai, S. (1983). Temperature-Induced Variations in the Surface Topology of Cultured Lymphocytes Are Revealed by Scanning Electron Microscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 70, 2492-2496.
51. Magin, R.L. (1983). Hyperthermia and Chemotherapy : When Will They Be Used in the Clinical Treatment of Cancer ? Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 19, 1655-1658.

52. Magin, R.L., Cysyk, R.L., Litterst, C.L. (1980). Distribution of Adriamycin in Mice under Conditions of Local Hyperthermia Which Improve Systemic Drug Therapy. *Cancer Treat. Rep.* 64, 203-210.
53. Magin, R.L., Sikic, B.T., Cysyk, R.L. (1979). Enhancement of Bleomycin Aktivität against Lewis Lung Tumors in Mice by Lokal Hyperthermia. *Cancer Res.* 39, 3792-3795.
54. Magun, B.E. (1982). Effects of Hyperthermia on Transport and Phosphorylation of Uridine and Cytosinarabinoside. *Radiat. Res.* 91, 279-281.
55. Marmor, J.B. (1979). Interactions of Hyperthermia and Chemotherapy in Animals. *Cancer Res.* 39, 2269-2276.
56. Marmor, J.B., Kozak, D., Hahn, G.M. (1979). Effects of Systemically Administered Bleomycin or Ariamycin wih Local Hyperthermia on Primary Tumor and Lung Metastases. *Cancer Treat. Rep.* 63, 1279-1290.
57. Merck Index (1983). Merck und Co., Inc., Rahway, USA, 10. Auflage.
58. Meyer, J.L. (1984). The Clinical Efficacy of Localized Hyperthermia. *Cancer Res. (Suppl.)* 44, 4745s-4751s.
59. Muchmore, J.H., Carter, R.D., Krementz, E.T. (1985). Regional Perfusion for Malignant Melanoma and Soft Tissue Sarcomas : A Review. *Cancer Invest.* 3, 129-143.
60. Muckle, D.S., Dickson, J.A. (1973). Hyperthermia (42 °C) as an Adjuvant to Radiotherapy and Chemotherapy in the Treatment of the Allogeneic VX2 Carcinoma in the Rabbit. *Br. J. Cancer* 27, 307-315.
61. Nauts, H.C., Fowler, G.A., Bogatko, F.H. (1953). A Review of the Influence of Bacterial Infections and of Bacterial Products (Coley's Toxin) on Malignant Tumors in Man. *Acta Med. Scand. Suppl.* 276, 145-152.
62. Overgaard, J. (1976). Combined Adriamycin and Hyperthermia Treatment of a Murine Mammary Carcinoma in Vivo. *Cancer Res.* 36, 3077-3081.
63. Overgaard, K., Overgaard, J. (1972). Investigations on the Possibility of a Thermic Tumor Therapy - I. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 8, 65-78.
64. Possinger, K. (1984). Klinische Wertigkeit von in vitro Stoffwechseluntersuchungen mit tritiierten Nukleinsäurepräkursoren an tierischen und menschlichen Tumorzellen. *Habilitationsschrift, München.*

65. Regel, V.B., Leone, L.A., Soderberg, C.H., Coleman, G.H., Robidoux, H.J., Fijman, R., Brown, J. (1983). Hyperthermic Adjuvant Perfusion Chemotherapy for Stage I Malignant Melanoma of the Extremity With Literature Review. *Cancer* 52, 2033-2039.
66. Robins, H.J. (1984). Role of Whole-Body Hyperthermia in the Treatment of Neoplastic Disease : Its Current Status and Future Prospects. *Cancer Res. (Suppl.)* 44, 4878s-4883s.
67. Rofstad, E.K., Brustad, I. (1982). Effect of Hyperthermia on Human Melanoma Cells Heated Either as Solid Tumors in Athymic Nude Mice or in Vitro. *Cancer* 50, 1304-1308.
68. Roizin-Towle, L., Hall, E.J., Capuano, L. (1982). Interaction of Hyperthermia and Cytotoxic Agents. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 61, 149-151.
69. Sauer, H., Jaenicke, L. (1974). Zur Aufhebung des zytostatischen Effekts von Amethopterin (Methotrexat) durch Methyl-Tetrahydrofolsäure. *Blut* 28, 321-326.
70. Sauer, H., Schalhorn, A., Wilmanns, W. (1978) Zum biochemischen Mechanismus des Citrovorum-Faktor-Schutzes nach hochdosierter Methotrexat-Behandlung maligner Tumoren. *Therapiewoche* 28, 7809-7814.
71. Sauer, H., Pelka-Fleischer, R., Wilmanns, W., Jehn, U., v. Krosigk, E. (1983). Biochemical and Cytokinetical Characterization of Smoldering Leukemia : Clinical Value and Therapeutic Consequences. Zur Veröffentlichung eingereicht.
72. Sauer, H., Schalhorn, A., Wilmanns, W. (1979). The Biochemistry of the Citrovorum Faktor Rescue Effect in Normal Bone Marrow Cells After High-Dose Methotrexate. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 13, 1203-1209.
73. Sauer, H., Wilmanns, W. (1984). Internistische Therapie maligner Erkrankungen, Klinik der Gegenwart (Hrsg. Bock, H.E., Gerok, W., Hartmann, F.), Urban und Schwarzenberg, München/Wien/Baltimore, S. E 237-249.
74. Shiu, M.H., Cahan, A., Fogh, J., Fortner, J.G. (1983). Sensitivity of Xenografts of Human Pancreatic Adenocarcinoma in Nude Mice to Heat and Heat Combined with Chemotherapy. *Cancer Res.* 43, 4014-4018.
75. Silberman, A.W., Rand, R.W., Storm, F.K., Drury, B., Morton, D.L. (1985). Phase I Trial of Thermochemotherapy for Brain Malignancies. *Cancer* 56, 48-56.
76. Song, C.W. (1984). Effect of Lokal Hyperthermia on Blood Flow and Microenvironment : A Review. *Cancer Res. (Suppl.)* 44,

4712s-4730s.

77. Storm, F.K., Baker, H.W., Scanlon, E.F., Plenk, H.P., Meadows, P.M., Cohen, S.C. et al. (1985). Magnetic-Induction Hyperthermia : Results of a 5-Year Multity-Institutional Cooperative Trial in Advanced Cancer Patients. *Cancer* 55, 2677-2687.
78. Storm, F.K., Elliot, R.S., Harrison, W.H., Kaiser, L.R., Morton, D.L. (1981). Radiofrequency Hyperthermia of Advanced Human Sarcomas. *J. Surg. Oncol.* 17, 91-98.
79. Storm, F.K., Harrison, W.H., Elliot, R.S., Morton, D.L. (1979). Normal Tissue and Solid Tumor Effects of Hyperthermia in Animal Models and Clinical Trials. *Cancer Res.* 39, 2245-2251.
80. Storm, F.K., Kaiser, L.R., Goodnight, J.E., Harrison, W.A., Elliot, R.S., Gomes, A., Morton, D.L. (1982). Thermochemotherapy for Melanoma Metastases in Liver. *Cancer* 49, 1243-1248.
81. Storm, F.K., Silberman, A.W., Ramming, K.R., Kaiser, L.R., Harrison, W.H., Elliot, R.S., Haskell, C.M., Sarna, G., Morton, D.L. (1984). Clinical Thermochemotherapy. A Controlled Trial in Advanced Cancer Patients. *Cancer* 53, 863-868.
82. Szczepanski, L., Trott, K.R. (1981). The Combined Effect of Bleomycin and Hyperthermia on the Adenocarcinoma 284 of the C3H Mouse. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 17, 997-1000.
83. Terasima, T., Takabe, Y., Katsumata, T., Watanabe, M., Umezawa, H. (1972). Effect of Bleomycin on Mammalian Cell Survival. *J. Natl. Cancer Inst.* 49, 1093-1100.
84. Twentyman, P.R., Morgan, J.E., Donaldson, J. (1978). Enhancement by Hyperthermia of the Effect of BCNU Against the EMT6 Mouse Tumor. *Cancer Treat. Rep.* 62, 439-443.
85. Urano, M., Kahn, J. (1983). The Change in Hypoxic and Chronically Hypoxic Fraction in Murine Tumors Treated with Hyperthermia. *Radiat. Res.* 96, 549-559.
86. Urano, M., Montoya, V., Booth, A. (1983). Effect of Hyperglycemia on the Thermal Response of Murine Normal and Tumor Tissues. *Cancer Res.* 43, 453-455.
87. Vanderzee, J., Vanrhone, G.C., Wikehooly, J.L., Faithful, N.S., Reinhold, H.S. (1983). Whole-Body Hyperthermia in Cancer Therapy - A Report of a Phase I-II Study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 1189-1200.

88. Vaupel, P., Müller-Kleiser, W., Otte, J., Manze, R., Kallinowski, F. (1983). Blood Flow, Tissue Oxygenation and pH Distribution in Malignant Tumors upon Localized Hyperthermia. Basic Pathophysiological Aspects and Role of Various Thermal Doses. *Strahlentherapie* 159, 73-81.
89. Wilmanns, W. (1963). Indikationen zur Behandlung akuter Leukämien mit 6-Mercaptopurin auf biochemischer Grundlage. *Dtsch. med. Wochenschr.*, 900-907.
90. Wilmanns, W., Mainzer, K., Müller, D., Talke, H., Hennekeuser, H.H. (1968). Zur Behandlung akuter Leukämien mit Cytosinarabinosid. *Dtsch. med. Wochenschr.*, 2509-2516.
91. Wilmanns, W., Sauer, H., Fleischer-Pelka, R. (1982). DNA-Synthesis and Cytokinetic Properties of Leukemic Cells. Their Role for the Control of Therapeutic Response in Acute Leukemia. 13th Intern. Cancer Congr. Seattle/USA.
92. Wilmanns, W., Sauer, H., Schalhorn, A. (1980). Biochemical Control of High-Dose Methotrexate/Leucovorin Rescue Therapy, In *Recent Results In Cancer Research*, Vol. 74 (Hrsg. Mathe, G., Muggia, F.M.), Springer-Verlag Berlin/Heidelberg, S. 42-49.
93. Wilmanns, W., Sauer, H., Wilms, W. (1974). Untersuchungen der DNS-Synthese als Grundlage für eine rationale Kombinationsbehandlung bei akuten Leukämien, *Klin. Pharmakol. u. experiment. Therapie*, IV. Kolloquium (Hrsg. Vogt, W., Bock, H.E.), Verlag Editio Cantor Aulendorf (1976), S. 3-19.
94. Yatvin, M.B., Abuirmeileh, N.M., Vorpahl, J.W., Elson, C.E. (1983). Biological Optimization of Hyperthermia : Modification of Tumor Membrane Lipids. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 657-663.
95. Yatvin, M.B., Clifton, K.H., Dennis, W.H. (1979). Hyperthermia and Lokal Anesthetics. Potentiation of Survival of Tumor-Bearing Mice. *Science* 205, 195-196.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

geboren am 04. Mai 1959.
in Göttingen.
Eltern Prof. Dr. med. Helmut Voth, Arzt für
Innere Medizin und Radiologie.
Dr. med. Hiltrud Voth, Ärztin.
Geschwister Eberhard Voth, Arzt und Diplomphysiker.
Familienstand ledig.
Konfession evangelisch.

Ausbildungsdaten

Schule 1966-1969 Grundschule Hermann-Ehlers-
Schule, Oldenburg.
1969-1978 Gymnasium Cäcilien-
schule, Oldenburg.
Mai 1978 Abitur.
Studium WS. 1978 Beginn des Studiums der Human-
medizin an der Georg-August-Universität,
Göttingen.
Aug. 1980 Ärztlich Vorprüfung.
Aug. 1981 Erster Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung.
Sep. 1981- Aug. 1982 Studium der Human-
medizin an der Universität von Los Angeles
Californien, USA.
Aug. 1983 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung.
Okt. 1984 Dritter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung.
Approbation Nov. 1984 Erteilung der Approbation als
Arzt.

